



Stabilisierung und Funktionalisierung von Calciumphosphat-Nanopartikeln mit Proteinen und Tetraetherlipiden

Dissertation

zur Erlangung des Akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

vorgelegt von

Martin Steinhäuser

geboren in Essen

Institut für Anorganische Chemie

der

Universität Duisburg-Essen

2009

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom August 2006 bis zum August 2009 im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Matthias Eppele im Institut für Anorganische Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Tag der Disputation: 15.12.2009

Gutachter: Prof. Dr. Matthias Eppele
Prof. Dr. Gebhard Haberhauer
Vorsitzender: Prof. Dr. Mathias Ulbricht

1 Übersicht

1.1 Inhaltsverzeichnis

1	Übersicht.....	2
1.1	Inhaltsverzeichnis	2
1.2	Abbildungsverzeichnis	6
2	Einleitung – Zielsetzung	13
2.1	Einleitung.....	13
2.2	Zielsetzung	13
3	Theoretische Grundlagen.....	16
3.1	Kolloidale Systeme	16
3.2	Calciumphosphate.....	18
3.3	Aminosäuren und Polyaminosäuren	20
3.3.1	Polyasparaginsäure	22
3.3.2	Polylysin.....	22
3.4	Proteine	23
3.4.1	Die Primärstruktur	24
3.4.2	Die Sekundärstruktur	24
3.4.3	Die Tertiärstruktur	27
3.4.4	Die Quartärstruktur.....	29
3.4.5	(Bovines) Serum-Albumin	30
3.4.6	Ubiquitin	31
3.4.7	Lysozym.....	31
3.5	Lipide und Tetraetherlipide aus hyperthermophilen Archaea.....	32
3.5.1	Allgemeines zu Lipiden	32
3.5.2	Allgemeines zu Tetraetherlipiden aus hyperthermophilen Archaea	33
3.5.3	Tetraetherlipide aus <i>Thermoplasma acidophilum</i>	36
3.5.4	Extraktion, Reinigung und Phosphorylierung des GDNT-Lipides aus der Rohmasse des <i>Sulfolobus solfataricus</i>	37

3.5.5	Anwendungsbeispiele für die Verwendung von Tetraetherlipiden.....	39
3.6	Dynamische Lichtstreuung und ζ -Potential.....	40
3.6.1	Dynamische Lichtstreuung.....	40
3.6.2	Wechselwirkungen.....	41
3.6.3	Das ζ -Potential.....	43
3.7	Kernresonanzspektroskopie	46
3.8	Massenspektrometrie	48
3.9	Rasterelektronenmikroskopie und energiedispersive Röntgenspektroskopie.....	48
3.10	Transmissionselektronenmikroskopie.....	50
3.11	Thermogravimetrie.....	50
3.12	Atomabsorptionsspektroskopie und Elementaranalyse	51
3.13	Infrarotspektroskopie (IR)	52
3.14	Reinigungsmethoden.....	53
3.14.1	Dialyse	53
3.14.2	Ultrazentrifuge.....	55
4	Ergebnisse und Diskussion.....	56
4.1	Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel in wässrigem Medium über Polyaminosäuren.....	56
4.1.1	Die Standard-Fällungsmethode	56
4.1.2	Polyasparaginsäure-Reihe.....	58
4.1.3	Polylysin-Reihe	66
4.1.4	Zusammenfassung und Diskussion der Polyaminosäure-Reihen	70
4.2	Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel in wässrigem Medium über Modellproteine.....	72
4.2.1	BSA-Reihe	72
4.2.2	Lysozym-Reihe	74
4.2.3	Ubiquitin-Reihe	76

4.2.4	Stabilisierung von Calciumphosphat-Nanopartikeln in NaCl-Lösung mit Modell-Proteinen	78
4.2.5	Zusammenfassung der Reihe zur Stabilisierung von Calciumphosphat Nanopartikeln in NaCl-Lösung mit Modell-Proteinen.....	79
4.2.6	Beladung der Nanopartikeloberfläche mit Proteinen	79
4.2.7	Zusammenfassung und Diskussion der Protein-Reihen zur Stabilisierung von Calciumphosphat Nanopartikeln in Wasser	80
4.3	Charakterisierung der Tetraetherlipid-Fraktion	83
4.3.1	NMR-Untersuchung	83
4.3.2	Massenspektrometrie des Tetraetherlipides	107
4.3.3	Zusammenfassung von NMR- und Massenspektrometrie des GDNT.....	110
4.4	Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel in wässrigem Medium durch Tetraetherlipide	112
4.4.1	Versuchsreihen mit einem vorgelegten Wasservolumen von 10 mL.....	112
4.4.2	Versuchsreihen mit einem vorgelegten Wasservolumen von 20 mL und 30 mL Wasser	116
4.4.3	Reihe mit sehr starker Lipidverdünnung vor der Zugabe der auf pH 8 eingestellten Calcium- und Phosphatlösungen	118
4.4.4	Reihe mit sehr starker Lipidverdünnung vor der Zugabe der auf pH 9 eingestellten Calcium- und Phosphatlösungen	121
4.4.5	Zusammenfassung der GDNT-Reihen mit verschiedenen vorgelegten Wasservolumina, Calcium- und Phosphatlösungs-mengen und pH Werten sowie variierten GDNT-Zugabemengen	129
4.4.6	Variationen der Fällungsmethode	131
4.4.7	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse aus der Variation der Fällungsmethode.....	134
4.5	Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel in Ethanol über Tetraetherlipide	137
4.5.1	Darstellung der Calciumphosphat-GDNT-Nanopartikel in Ethanol.....	137
4.5.2	Reinigung der Calciumphosphat-GDNT-Nanopartikel in Ethanol.....	145

4.5.3	Charakterisierung der Calciumphosphat-GDNT Nanopartikel in Ethanol.....	150
4.6	Funktionalisierung der Calciumphosphat-GDNT-Kolloide.....	156
4.6.1	Funktionalisierung der Calciumphosphat-GDNT-Kolloide mit BSA	157
4.6.2	REM-Bilder der Funktionalisierungsreihe der Calciumphosphat-GDNT-Kolloide mit BSA	159
4.6.3	Funktionalisierung der Calciumphosphat-GDNT-Kolloide mit Lysozym	161
4.6.4	REM-Bilder der Funktionalisierungsreihe der Calciumphosphat-GDNT-Kolloide mit Lysozym	163
4.6.5	Funktionalisierung der Calciumphosphat-GDNT-Kolloide mit Ubiquitin	164
4.6.6	REM-Bilder der Funktionalisierungsreihe der Calciumphosphat-GDNT-Kolloide mit Ubiquitin.....	165
4.6.7	Reinigung der funktionalisierten GDNT-CaP-Nanopartikel	166
4.6.8	Abschätzung der Beladung der GDNT-CaP-Nanopartikel mit den Proteinen	167
4.6.9	Zusammenfassung der Funktionalisierung der Calciumphosphat-GDNT-Kolloide mit BSA, Lysozym und Ubiquitin	168
4.7	Charakterisierung der phosphorylierten Tetraetherlipid-Fraktion.....	170
4.7.1	MS-Untersuchung	170
4.7.2	NMR-Untersuchung	173
4.7.3	IR-Spektroskopie des GDNT-P	182
4.8	Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel in verschiedenen Medien über einen phosphorylierten Tetraetherlipid	183
4.8.1	GDNT-P Reihe in Wasser und einem Wasser-Isopropanol-Gemisch	184
4.8.2	GDNT-P Reihe in Ethanol	184
4.8.3	GDNT-P Reihe in Isopropanol	186
4.8.4	Charakterisierung der GDNT-P Nanopartikel.....	189
4.9	Funktionalisierung der GDNT-P-Calciumphosphat-Nanopartikel durch verschiedene Proteine.....	193
4.10	Redispergierbarkeit der GDNT-P-Calciumphosphat-Nanopartikel ind Wasser...	196
5	Stand der Literatur, Zusammenfassung, Abschlussdiskussion, Ausblick.....	198

5.1	Stand der Literatur	198
5.2	Zusammenfassung, Abschlussdiskussion, Ausblick	201
6	Anhang.....	204
6.1	Verwendete Chemikalien.....	204
6.2	Danksagung	205
6.3	Lebenslauf	206
6.4	Publikationsliste	208
6.5	Erklärung	209
6.6	Literatur	210

1.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1 - Darstellung der allgemeinen Struktur einer Aminosäure.....	21
Abbildung 3.2 - Darstellung der Kondensation zweier Aminosäuren unter Ausbildung der Peptidbindung.....	21
Abbildung 3.3 - Asparaginsäure	22
Abbildung 3.4 - Lysin	23
Abbildung 3.5 - Strukturelle Organisationsebenen von Proteinen anhand des Hämoglobins.....	24
Abbildung 3.6 - Darstellung einer α -Helix und eines β -Faltblattes.....	25
Abbildung 3.7 - Das β -Faltblatt (antiparallele und parallele Darstellung)	26
Abbildung 3.8 - Darstellung einiger Tertiärstruktur-Motive	27
Abbildung 3.9 - Tertiärstruktur von Ubiquitin.....	28
Abbildung 3.10 - Tertiärstruktur von Lysozym.....	28
Abbildung 3.11 - Darstellung eines Hämoglobinmoleküls und eines Zinkfinger motives.	29
Abbildung 3.12 - Verschiedene Mizellentypen.....	32
Abbildung 3.13 - Darstellung der Strukturen von Di- und Tetraetherlipiden	35
Abbildung 3.14 - Verschiedene Gruppen für R' und R'' von Tetraetherlipiden	36
Abbildung 3.15 - Vier verschiedene Fälle der Potentialveränderung zur Erklärung der DLVO-Theorie	42

Abbildung 3.16 - Schematische Darstellung der Stern- und der diffusen Schicht sowie des ζ -Potentials.....	43
Abbildung 3.17 - Darstellung der Ionenwanderung in einer Lösung bei angelegter Spannung.....	44
Abbildung 3.18 - Darstellung des Isoelektrischen Punktes.....	45
Abbildung 3.19 - Darstellung der Dialyse-Methode, welche zuerst auf mehreren Einzelrührplatten durchgeführt wurde, später auf der Mehrfachrührplatte.....	54
Abbildung 4.1 - Schematische Darstellung der Standard-Fällungsapparatur.....	57
Abbildung 4.2 - REM-Aufnahme einer Probe der PAsp-Reihe mit 20 mL Wasservolumenvorlage, 1 mL PAsp-Lösung und je 3 mL Calcium- und Phosphatlösung (pH 8) zugetropft (Probe nach 30 min Rühren, 15-30 kDa-Kette).	60
Abbildung 4.3 - REM-Aufnahme einer Probe der PAsp-Reihe mit 20 mL Wasservolumenvorlage, 1 mL PAsp-Lösung und je 3 mL Calcium- und Phosphatlösung zugetropft (pH 8) (Probe nach ~20 Tagen, 5-15 kDa-Kette).	61
Abbildung 4.4 - Vergleich der Partikelgrößenverteilung von PAsp-Proben mit 5-15 kDa und 15-30 kDa Ketten (30 mL Wasservorlage und 3 mL Calcium- sowie Phosphatlösungszugabe).....	63
Abbildung 4.5 - Vergleich der Partikelgrößenverteilung von PAsp-Proben mit verschiedenen Kettenlängen (30 mL Wasservorlage und 4 mL Calcium- sowie Phosphatlösungszugabe).....	64
Abbildung 4.6 - PAsp-Reihe (lange Kette) mit 30 mL Wasservorlage, nach 5 mL Calcium- und Phosphatlösungszugabe, Partikelgrößenverteilung	65
Abbildung 4.7 - PAsp-Reihe (kurze Kette) mit 30 mL Wasservorlage, nach 5 mL Calcium- und Phosphatlösungszugabe, Partikelgrößenverteilung	65
Abbildung 4.8 - Typische Morphologie der PAsp-Reihe (Wasservolumen 30 mL, 1 mL der langkettigen PAsp-Lösung und je 5 mL Calcium- und Phosphatlösungszugabe). ...	66
Abbildung 4.9 - Größenverteilung der PLys-Reihe (lange Kette) mit einer Calcium- und Phosphatlösungszugabe von 4 mL, ohne Ultraschallbehandlung	68
Abbildung 4.10 - Größenverteilung der PLys-Reihe (lange Kette) mit einer Calcium- und Phosphatlösungszugabe von 4 mL, nach Ultraschallbehandlung	69
Abbildung 4.11 - REM-Aufnahme mit höherer Auflösung und Vergrößerung der Nanopartikel einer PLys-Reihe (4 mL Calcium- und Phosphatlösung) nach ~6 Tagen.	70

Abbildung 4.12 - REM-Aufnahme der Lysozym-Calciumphosphat Nanopartikel, die bei pH 8 hergestellt wurden	76
Abbildung 4.13 - Ubiquitin-Calciumphosphat Nanopartikel nach 30 min und einer Zugabe von je 2 mL Calcium- und Phosphatlösung.....	77
Abbildung 4.14 - Darstellung der Beschichtungstypen von kleinen Partikeln mit einer stabilisierenden Komponente	82
Abbildung 4.15 - GDNT-Struktur	83
Abbildung 4.16 - 700 MHz- ¹ H NMR-Spektrum des Tetraetherlipids (Bereich 0 - 2,1 und 2 - 4,5 ppm)	84
Abbildung 4.17 - Struktur des Lipides mit den von <i>ChemBioDraw</i> berechneten chemischen Verschiebungen im NMR-Protonen-Spektrum.....	86
Abbildung 4.18 - GDNT-Struktur und 400 MHz- ¹ H-Ausschnitt des 0,7-0,95 ppm-Bereiches	87
Abbildung 4.19 - GDNT-Struktur und 700 MHz- ¹ H-Ausschnitt des 1,0-1,5 ppm-Bereiches	88
Abbildung 4.20 - GDNT-Struktur und 700 MHz- ¹ H-Ausschnitt des 1,5-1,9 ppm Bereiches	89
Abbildung 4.21 - GDNT-Struktur und 700 MHz- ¹ H-Ausschnitt des 2,2-2,8 ppm Bereiches	90
Abbildung 4.22 - GDNT-Struktur und 700 MHz- ¹ H-Ausschnitt des 3,1-4,25 ppm Bereiches	91
Abbildung 4.23 - Struktur des acetylierten Calditols ohne Lipid und des unacetylierten Calditols mit einer Etherbrücke.....	92
Abbildung 4.24 - ¹ H-Spektrum berechnet von <i>ChemBioDraw</i>	92
Abbildung 4.25 - 400 MHz- ¹ H-Spektrum mit den Flächenintegralen	93
Abbildung 4.26 - Zu erwartende chemische Verschiebung des NMR- ¹³ C-Spektrums an der Struktur dargestellt	95
Abbildung 4.27 - Gemessenes 700 MHz- ¹³ C-Spektrum - ohne den signalfreien Bereich von 48-58 ppm	95
Abbildung 4.28 - Gemessenes 700 MHz-DEPT-135-Spektrum, ohne den signalfreien Bereich von 48-58 ppm	96
Abbildung 4.29 - CH ₃ -Gruppen Signale im 700 MHz- ¹³ C-NMR-Spektrum.....	99
Abbildung 4.30 - ¹³ C-Signale im 700 MHz-DEPT-135-Spektrum - Bereich 24-28 ppm	100

Abbildung 4.31 - ^{13}C -Signale im 700 MHz-DEPT-135-Spektrum - Bereich 29,5-32 ppm	101
Abbildung 4.32 - ^{13}C -Signale im 700 MHz-DEPT-135-Spektrum - Bereich 33-40 ppm	102
Abbildung 4.33 - ^{13}C -Signale im 700 MHz-DEPT-135-Spektrum - Bereich 44-47 ppm	103
Abbildung 4.34 - ^{13}C -Signale im 700 MHz-DEPT-135-Spektrum - Bereich 64-90 ppm	104
Abbildung 4.35 - 700 MHz-2D- ^1H - ^{13}C -Spektrum (senkrecht ^{13}C -Spektrum 15-100 ppm, waagerecht ^1H -Spektrum von 0-4 ppm)	106
Abbildung 4.36 - Vergrößerung des Molekülpeaks im Massenspektrum	108
Abbildung 4.37 - Mechanismus der 5er-Ring-Öffnung im Rückgrad des Lipides bei der Biosynthese	108
Abbildung 4.38 - Angenommene Struktur des Lipides	109
Abbildung 4.39 - Massenspektrenausschnitt mit einem Peak bei m/z 1477,28	109
Abbildung 4.40 - Massenspektrenausschnitt mit einem Peak bei m/z 1479,30	109
Abbildung 4.41 - Massenspektrenausschnitt mit einem Peak bei m/z 1481,31	110
Abbildung 4.42 - Diagramm zur Veränderung der Partikelgrößen: Abhängigkeit der GDNT-Reihe mit 10 mL Wasser von verschiedenen Calcium- und Phosphatlösungszugaben und mit je 1 mL GDNT-Lösung	113
Abbildung 4.43 - Größenverteilung nach der DLS der Reihe 10 mL Wasservorlage, je 0,75 mL Calcium- und Phosphatlösung und 1 mL GDNT-Lösung über einen Zeitraum von ca. 3 Monaten	115
Abbildung 4.44 - 1 mL GDNT in 10 mL H_2O bei einer Zugabe von je 0,75 mL Calcium und Phosphatlösung (eingestellt auf pH 8)	116
Abbildung 4.45 - Vesikelgröße des GDNT in 20 mL Wasser	117
Abbildung 4.46 - Größenverteilung einer Probe mit 20 mL Wasser und der Zugabe von je 0,25 mL Calcium- und Phosphatlösung	117
Abbildung 4.47 - Repräsentative DLS-Messung der Messreihe mit verdünnter Vorlage der Lipidlösung	119
Abbildung 4.48 - Nanopartikel der GDNT-Reihe mit stark verdünnter GDNT-Vorlage vor der Reinigung durch Ultrazentrifugation	120
Abbildung 4.49 - DLS-Diagramm zur Messreihe 10 mL Wasser, 0,25 mL GDNT, Calcium- und Phosphatlösung auf pH 9 eingestellt, Typ 2	123
Abbildung 4.50 - DLS-Diagramm zur Messreihe 10 mL Wasser, 0,25 mL Calcium- und Phosphatlösung (pH 9), 0,9 mL GDNT-Lösung, Typ 3 - unzentrifugiert	124

Abbildung 4.51 - DLS-Diagramm zur Messreihe 10 mL Wasser, 0,25 mL Calcium- und Phosphatlösung (pH 9), 0,9 mL GDNT-Lösung, Typ 3 - zentrifugiert.....	125
Abbildung 4.52 - REM-Aufnahme der Probe mit 10 mL Wasservorlage und 0,25 mL Calcium- und Phosphatlösung (pH 9).....	126
Abbildung 4.53 - Darstellung des Vesikelabbaues: 20 mL Wasservorlage mit 0,8 mL GDNT, 0,25 mL + 0,25 mL Calcium- und Phosphatlösung (pH 9).....	127
Abbildung 4.54 - Darstellung des Vesikelabbaues: 20 mL Wasservorlage mit 0,8 mL GDNT, 0,25 mL + 0,25 mL Calcium- und Phosphatlösung (pH 9).....	128
Abbildung 4.55 - REM-Aufnahme einer Probe mit 20 mL Wasser- und 0,8 mL GDNT-Vorlage, 0,5 mL Calcium- und Phosphatlösungszugabe (pH 9), ohne Reinigung	129
Abbildung 4.56 - Morphologie der Partikel nach der Darstellung über Methode II ohne Reinigung.....	133
Abbildung 4.57 - Morphologie der Partikel nach der Darstellung über Methode II nach der Reinigung	134
Abbildung 4.58 - Diagramm zur Partikelgrößenveränderung von GDNT-Calciumphosphat-Nanopartikeln (0,25 mL GDNT)	138
Abbildung 4.59 - Diagramm zur Partikelgrößenveränderung von GDNT-Calciumphosphat-Nanopartikeln (0,5 mL GDNT)	140
Abbildung 4.60 - REM-Aufnahme einer Standard-GDNT-Probe.....	141
Abbildung 4.61 - Diagramm zur Reproduzierbarkeit der Standard-GDNT-Proben	141
Abbildung 4.62 - Größenverteilung der auf Reproduzierbarkeit getesteten vier Standard-GDNT-Proben nach 18 Tagen Alterung.	142
Abbildung 4.63 - Größenverteilung der auf Reproduzierbarkeit getesteten vier Standard-GDNT-Proben nach 39 Tagen Lagerung.	143
Abbildung 4.64 - Reproduzierbarkeit der Standard-GDNT-Probe (doppelter Ansatz) ..	144
Abbildung 4.65 - REM-Aufnahme der Nanopartikel eines 40 mL Ethanol Standard-GDNT-Ansatzes	144
Abbildung 4.66 - TEM-Aufnahme der Standard GDNT-Probe vor der Reinigung.....	145
Abbildung 4.67 - REM-Aufnahme der GDNT-Nanopartikel nach 6 h Dialyse in Ethanol	147
Abbildung 4.68 - REM-Aufnahme der GDNT-Nanopartikel nach 22 h Dialyse in Ethanol	148
Abbildung 4.69 - REM-Aufnahme einer Dialyse-Probe mit Mediumwechsel nach 2 h ..	149

Abbildung 4.70 - REM-Aufnahme der Nanopartikel nach 3 min Ultraschallbehandlung und Dialyse mit Mediumwechsel nach 2 h	150
Abbildung 4.71 - EDX-Messung der GDNT-CaP-Nanopartikel nach der Dialyse	151
Abbildung 4.72 - IR-Diagramm von KBr-Presslingen des GDNT verglichen mit den CaP-GDNT-Kolloiden vor der Dialyse	154
Abbildung 4.73 - Calciumphosphat-GDNT-Nanopartikel mit BSA-Lösung, 10 min nach der Funktionalisierung	157
Abbildung 4.74 - Calciumphosphat-GDNT-Nanopartikel mit BSA-Lösung, zwei Tage nach der Funktionalisierung.....	158
Abbildung 4.75 - Calciumphosphat-GDNT-Nanopartikel (in Ethanol) mit wässriger BSA-Lösung, 15 Tage nach der Funktionalisierung	158
Abbildung 4.76 - REM-Aufnahme der Nanopartikel funktionalisiert mit 0,1 mL BSA-Lösung direkt nach der Fällung.	159
Abbildung 4.77 - REM-Aufnahme der Nanopartikel funktionalisiert mit 0,1 mL BSA-Lösung nach 21 Tagen.....	160
Abbildung 4.78 - REM-Aufnahme der Calciumphosphat-GDNT-Nanopartikel, funktionalisiert mit 0,3 mL BSA-Lösung direkt nach der Fällung.....	161
Abbildung 4.79 - Calciumphosphat-GDNT-Nanopartikel mit 0,1 mL Lysozym-Lösung funktionalisiert	162
Abbildung 4.80 - Calciumphosphat-GDNT-Nanopartikel mit 0,2 mL Lysozym-Lösung funktionalisiert	163
Abbildung 4.81 - REM-Aufnahme der Calciumphosphat-GDNT-Nanopartikel funktionalisiert mit 0,1 mL Lysozym-Lösung (direkt nach Rühren)	164
Abbildung 4.82 - Calciumphosphat-GDNT-Nanopartikel mit 0,1 mL Ubiquitin-Lösung funktionalisiert	165
Abbildung 4.83 - REM-Aufnahme der Calciumphosphat-GDNT-Nanopartikel funktionalisiert mit 0,1 mL Ubiquitin-Lösung.	166
Abbildung 4.84 - Schema zur Reaktion des GDNT mit POCl_3 zu GDNT-P und die daraus folgende Struktur des Lipides bei maximaler Phosphorylierung	172
Abbildung 4.85 - Gesamtes Massenspektrum des GDNT-P	172
Abbildung 4.86 - 700 MHz-NMR- ^1H -Spektrum GDNT gegen GDNT-P im Bereich von 0,82-0,92 ppm aufgetragen.....	174

Abbildung 4.87 - 700 MHz-NMR- ¹ H-Spektrum GDNT gegen GDNT-P im Bereich von 1,0-1,85 ppm aufgetragen.....	175
Abbildung 4.88 - 700 MHz-NMR- ¹ H-Spektrum GDNT gegen GDNT-P im Bereich von 2,2-2,8 ppm aufgetragen.....	175
Abbildung 4.89 - 700 MHz-NMR- ¹ H-Spektrum GDNT gegen GDNT-P im Bereich von 3,4-4,4 ppm aufgetragen.....	176
Abbildung 4.90 - 400 MHz-NMR- ³¹ P-Spektrum	177
Abbildung 4.91 - Angenommene Struktur des GDNT-P nach vollständiger Phosphorylierung zum Vergleich der ppm-Veränderung im ¹³ C-Spektrum	178
Abbildung 4.92 - 700 MHz-2D- ¹ H- ¹³ C-Spektrum des GDNT-P ¹ H-Bereich 0,5-2,5 ppm, ¹³ C-Bereich 10-60 ppm.....	180
Abbildung 4.93 - 700 MHz-2D- ¹ H- ¹³ C-Spektrum des GDNT-P ¹ H-Bereich 3,25-4,5 ppm, ¹³ C-Bereich 50-80 ppm.....	180
Abbildung 4.94 - IR-Spektren eines KBr-Presslings des GDNT-P und GDNT	182
Abbildung 4.95 - REM-Aufnahme der GDNT-P Probe 40-0,25-1,0 in Ethanol	184
Abbildung 4.96 - DLS Messung der GDNT-P-CaP-Nanopartikel in Ethanol synthetisiert	185
Abbildung 4.97 - DLS Messung der GDNT-P-CaP-Nanopartikel in Ethanol synthetisiert nach der Ultraschallbehandlung für 1 min und 2 min	185
Abbildung 4.98 - REM-Aufnahme der GDNT-P Probe 40-0,25-1,0 in Ethanol	186
Abbildung 4.99 - REM-Aufnahmen einer Standard-GDNT-P-Probe vor und nach Ultraschallbehandlung	187
Abbildung 4.100 - REM-Aufnahme der GDNT-P-Nanopartikel nach dem Redispergieren durch 1 min Ultraschallbad-Behandlung.....	188
Abbildung 4.101 - TG-Kurve der GDNT-P-CaP-Nanopartikel	191
Abbildung 4.102 - IR-Spektrum zur TG-Kurve der GDNT-P-CaP-Nanopartikel nach ~10.000s Messzeit.....	192
Abbildung 4.103 - IR-Spektren des GDNT-P und der Kolloide gegenüber dargestellt .	192
Abbildung 4.104 - REM-Aufnahmen der GDNT-P-CaP-Nanopartikel mit BSA 0,2 mL.	194
Abbildung 4.105 - REM-Aufnahmen der funktionalisierten GDNT-P-CaP-Nanopartikel mit je 0,4 mL Proteinlösung versetzt.....	195
Abbildung 4.106 - REM-Aufnahme der in Wasser redispergierten GDNT-P-CaP-Nanopartikel	196

2 Einleitung - Zielsetzung

2.1 Einleitung

Die vorliegende Forschungsarbeit befasst sich mit Nanopartikeln in kolloidalen Systemen. Partikel werden als Nanopartikel bezeichnet, wenn sie in der Größenordnung von weniger als 100 nm liegen. Ein Nanometer (nm) ist mit 10^{-9} Metern (m) definiert, was dem Größenverhältnis von einer 1 Centmünze (nm) verglichen mit dem Durchmesser der Erde (m) entspricht. Die Anwendung der Nanotechnologie findet mittlerweile in allen Lebensbereichen statt. Sie reicht von Fenstergläsern, Keramiken, wasserabweisenden Oberflächen, kratzfesten Fahrzeuglacken bis hin zu antibakteriell beschichteter Kleidung. Nicht zuletzt revolutionierte die Nanotechnologie die Miniaturisierung der Elektrotechnik sowie die Medizin. Die Biokompatibilität von medizinischen Anwendungen ist mit der Ausbildung von Nanostrukturen oder Verwendung von Nanopartikeln eng verknüpft.

Die Oberfläche eines Stoffes ist ausschlaggebend für chemische, magnetische, optische, elektrische und mechanische Eigenschaften des Materials. Anwendungen, die auf Nanostrukturen zurückgreifen, wird so eine Beeinflussung dieser Eigenschaften ermöglicht, da sie die große spezifische Oberfläche des Materials nutzen. Ein kreisrundes Partikel mit einem Radius von 1 mm besitzt eine Oberfläche von $3,14 \text{ mm}^2$. Wird dies mit Nanopartikeln verglichen, die einen Kubikmillimeter füllen, zeigt sich, dass die Oberfläche bei $3,14 \text{ cm}^2$ liegt. Die Auswirkung der großen Oberfläche ist beispielsweise für die Anwendung von Katalysatoren von Bedeutung. In diesem Fall beeinflusst die große Oberfläche des Katalysators die Wahrscheinlichkeit der Anlagerung von Reaktanden und erhöht somit die Reaktionsgeschwindigkeit. Dies führt zu einer Erhöhung der Effektivität des Katalysators um ein Vielfaches, im Vergleich zu einem massiven Block gleicher Masse und gleichen Materials. Dies verdeutlicht die Bedeutung der Nanotechnologie in Wirtschaft und Industrie.

2.2 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollen neue Anwendungsmöglichkeiten für Knochenersatzmaterialien entwickelt werden. Hierzu sollte die Stabilisierung von Calciumphosphat, dem

anorganischen Grundbaustein des Knochens, mit bioaktiven Substanzen erfolgen. Eine anschließende Funktionalisierung mit Biomolekülen sollte ermöglicht werden.

Die Nanotechnik führt in der Medizin zu vielen Verbesserungen und Entwicklungen diverser Methoden und Anwendungen^[1-7]. Knochenersatzmaterialien finden unter anderem Anwendung bei der Beschichtung von Implantaten zur Verbesserung der Biokompatibilität^[8-14], der Herstellung von biodegradierbaren^[15-19] oder porösen^[20,21] Materialien. Als weitere wichtige Aspekte seien auch *Drug Delivery* und *Tissue Engineering*^[22-29] genannt.

Die Beschichtung von Implantaten mit körperversandten Substanzen erweist sich als sinnvoll, da es sonst häufig zu einer Immunantwort, also zur Abstoßung des Implantates, kommt. Die Beschichtung wird im Idealfall vom Immunsystem nicht als Fremdkörper eingestuft, wodurch es zu einer optimalen Verwachsung zwischen Gewebe und Implantat kommt. Dies kann durch die Anreicherung von Wirkstoffen im verwendeten Beschichtungsmaterial katalysiert werden. Effizienz wird durch eine kontrollierte Wirkstofffreisetzung erzielt, so dass die Konzentration dieser Substanz möglichst lange im therapeutisch wirksamen Bereich liegt. Dies kann durch eine gezielte Funktionalisierung erreicht werden, was in den Forschungsbereich des *Drug Delivery* fällt.

Wird nun ein temporäres Implantat benötigt, wie z.B. bei einfachen Brüchen, so kommt es zu einer Destabilisierung des vorhandenen Knochens aufgrund der Entlastung durch das Implantat. Die zwar erwünschte Entlastung des behandelten Knochens zieht jedoch einen Abbau der Knochensubstanz nach sich. So kann nach dem Entfernen des Implantats sehr leicht ein erneuter Bruch erfolgen. Zudem ist die Adaption des Körpers an die ursprüngliche Belastung von langer Dauer. Durch den Einsatz biodegradierbarer Stoffe wird dies umgangen, da es zu einem kontinuierlichen Abbaus des Implantates bei gleichzeitigem natürlichem Aufbau des Knochens kommt.

Ein weiterer Vorteil der Verwendung von biodegradierbaren Implantaten ist die Fähigkeit des Körpers, den Knochen im Laufe der Zeit permanent auf- und abzubauen^[16,30], was minimalen Fehlern im Knochengerüst entgegenwirkt. Osteoblasten und Osteoklasten^[31,32] sind für diesen Prozess zuständig, welcher mit nicht abbaubaren Metallimplantaten unmöglich wird.

So zeichnet sich ab, dass die Verwendung auch von optimalen Metallimplantaten längerfristig keine umfassende Lösung darstellt. Dies gilt besonders für mechanisch belastete Implantate wie beispielsweise Hüftgelenke, die eine begrenzte Lebensdauer aufweisen. Bei steigender Alterung der Menschen wird so eine Revision der Endoprothese nötig.

Idealer wären biodegradierbare Implantate, bei welchen durch ein optimales *Drug Delivery System*, auch bei älteren Individuen ein natürliches Knochenwachstum reinduziert wird. Folglich würde eine Revision entfallen. Dies ist jedoch zum aktuellen Zeitpunkt noch fiktiv, wäre aber bei der Funktionalisierung der Nanopartikel durch bestimmte Proteine wie z.B. Wachstumsfaktoren möglich. Auch könnten bestimmte Wirkstoffe aus Medikamenten hier zur Funktionalisierung genutzt werden. Somit wird hier das Ziel der Arbeit verdeutlicht, Calciumphosphat-Nanopartikel herzustellen, die mit Modellproteinen funktionalisiert werden können und in der weiteren Entwicklung der Arbeit mit speziellen Proteinen beladen und funktionalisiert werden.

In den Kapiteln dieser Arbeit wird jedoch deutlich, dass die Kluft zwischen Theorie und Praxis bisweilen sehr groß erscheint.

Die zu diesem Zweck synthetisierten und analysierten Nanopartikel wurden unter verschiedensten Versuchsbedingungen gewonnen. Zwei Stabilisierungs- und Funktionalisierungsansätze teilen die Arbeit grob betrachtet auf: Der erste Ansatz war die Verwendung von Polyaminosäuren (Kapitel 4.1) und Modell-Proteinen (Kapitel 4.2) zur Stabilisierung und Funktionalisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel. Hierbei sollten die Nanopartikel zuerst mit Polyelektrolyten (Polyaminosäuren) stabilisiert werden und anschließend eine Funktionalisierung mit Modell-Proteinen erfolgen. Der zweite Ansatz lag in einer Verknüpfung der Proteine mit den Nanopartikeln über einen Linker. Dies sollten die verwendeten Tetraetherlipide (Kapitel 4.4 bis 4.10) ermöglichen.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Kolloidale Systeme

Ein kolloiddisperses System beschreibt eine Zustandsform der Materie, die durch die gleichmäßige Verteilung (Lösung) von Teilchen, mit einem Durchmesser von 1 bis 100 nm, in einem Dispersionsmittel gekennzeichnet ist. Teilchen dieser Größenordnung werden als Nanopartikel bezeichnet. Die Grenzflächen- und Kolloidchemie beschäftigt sich unter anderem mit den Teilcheneigenschaften dieser Systeme sowie dem Aufbau und den Eigenschaften verschiedener Arten von Grenzflächen. Die kolloidale Dimension beschreibt den Zustand der Materie zwischen heterogenen und homogenen Systemen. Heterogene Systeme sind unter Zuhilfenahme einer Lupe oder einem Mikroskop für das menschliche Auge sichtbar. Homogene Systeme hingegen stellen Moleküle oder Ionen in Lösung dar, welche nicht ohne weiteres vom menschlichen Auge wahrgenommen werden können. Der Bereich der homogenen Systeme erstreckt sich über eine Teilchengröße von einem Ångström bis hin zu einem Nanometer. Es folgt der Bereich der kolloidalen Dimension, welche sich von einem Nanometer bis zu einem Mikrometer erstreckt. An diesen Bereich schließt sich das heterogene System an, welches bis zu einer Teilchengröße von einem Millimeter und mehr reicht^[33-37].

W. Ostwald beschrieb Kolloide als Systeme, welche aus einer dispergierten bzw. diskontinuierlichen Phase (Nanopartikel) bestehen, die gleichmäßig in fein verteiltem Zustand in einem Dispersionsmittel bzw. einer kontinuierlichen Phase (Lösungsmittel) vorliegen. Diese Phasen können in den drei Aggregatzuständen fest, flüssig und gasförmig vorliegen. Hieraus lassen sich viele mögliche Formen für Kolloide ableiten, die sich durch verschiedene disperse Phasen und Dispersionsmittel unterteilen lassen. Nebel und Dunst sind flüssige Partikel in einem Gas verteilt. Rauch hingegen ist ein Gemisch aus festen Partikeln in einem Gas. Milch, Butter, Creme sind flüssige Partikel in einer flüssigen Umgebung. Des Weiteren sind Farben, Lacke (Feststoff in Flüssigkeit) und Schlämme, Schäume (Gase in einer Flüssigkeit), Gele, Opalglas (Feststoff in einem Feststoff) und auch Rubinglas kolloidale Systeme. Auch in biologischen Systemen sind kolloidale Dispersionen zu finden, auch wenn deren Größen nicht mehr exakt in die Nanopartikel-Definition passen. Beispielsweise ist das Blut eine kolloidale Dispersion von Blutzellen im Blutserum ($> 1 \mu\text{m}$), und die Knochensubstanz ist eine Calciumphosphat-Kollagen-Matrix-Dispersion^[33-35].

Wird von fein verteilten Stoffen gesprochen, so gehen die Werte je nach Literaturstelle auseinander, aber in der Regel liegen die Größen der Partikel zwischen 1 nm und 1 μ m. In einzelnen Fällen von Emulsionen oder Aufschwemmungen können auch größere Partikel vorhanden sein. Prinzipiell werden die Partikel durch thermische Bewegung in der Suspension gehalten. Agglomerieren sie, so werden sie vom Einfluss der Gravitation ausgefällt. Haben die Teilchen annähernd die gleiche Größe, so bezeichnet man sie als mono- oder isodispers, Gegenteiliges als polydispers. Bei der Stabilität von kolloidalen Systemen ist durch die große Oberfläche bedingt ein großes Problem die Folge: Systeme tendieren bei konstanter Temperatur grundsätzlich dazu, spontan den Zustand geringster freier Energie einzunehmen. Bei kolloidalen Partikeln liegt ein Großteil der Moleküle an der Grenzfläche zwischen dispergierter und kontinuierlicher Phase vor, so dass die Oberflächenenergie der Partikel einen großen Einfluss auf die gesamte Reaktionsfähigkeit des Systems hat. Der Einfluss ist stark, da sich mit der Zunahme der Oberfläche die freie Enthalpie proportional erhöht. Somit geht das System nicht sofort in einen stabilen Zustand über, sondern durchläuft einen metastabilen Zustand. Die Stabilität des Zustandes ist wiederum von einigen Faktoren abhängig: Wichtig sind z.B. die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Teilchen (van-der-Waals Kräfte/Coulomb-Kraft oder Wasserstoffbrückenbindungen). Wirken sie abstoßend oder anziehend, welche Vorteile bietet das Dispersionsmittel für die Ausbildung einer elektrostatischen Doppelschicht an der Partikeloberfläche? In Kapitel 3.5, werden einige diese Aspekte genauer betrachtet.

Geschichtlich betrachtet gehörte P.J. Macquer^[35] zu den ersten Wissenschaftlern, die sich mit der Feinverteilung von Stoffen in einer Dispersion beschäftigten. Er postulierte 1744 die Vermutung, dass Goldpartikel im *aureum potabile* (uns als rotes kolloidal-gelöstes Gold bekannt) sehr fein verteilt sind. Experimente, die dies bestätigten, wurden jedoch erst Anfang des 19. Jahrhunderts durchgeführt. Das Wort Kolloid wurde erstmals 1861 von Th. Graham für Systeme verwendet, die nur schwer durch eine Membran diffundieren. Genaue Untersuchungen sind jedoch erst seit der Entwicklung moderner Methoden wie z. B. Rasterelektronenmikroskopie, Streuung von Licht bestimmter Wellenlängen, Neutronenstreuung, magnetischer Kernresonanz und optischer Spektroskopie möglich^[35].

3.2 Calciumphosphate

Calciumphosphat ist neben dem Calciumcarbonat das wichtigste Biomineral, das auf Calcium basiert. Aufgrund einer hohen Vielfalt im Bezug auf die chemische Struktur und der biologischen Relevanz bietet sich in der Anwendung eine Vielzahl von Adaptionsmöglichkeiten mit biologischer Kompatibilität. Neben dem Menschen bilden viele andere Organismen Calcium-Verbindungen zur Bildung stabilisierender Strukturen (Knochen, Knorpel etc.) aus. Panzer und Schalen dienen zum Schutz und Scheren, Zähne, Stacheln als Werkzeuge oder Waffen der Organismen. Aber auch manche Organe beinhalten anorganische Strukturen, wie z. B. das Schweresinnesorgan von Quallen. Die Mannigfaltigkeit an chemischen Modifikationen basiert auf der Phosphorsäure. Ihr Anion liegt bei steigenden pH-Werten als H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} und PO_4^{3-} vor. Diese Phosphationen können mit Calciumionen entsprechende Salze bilden, welche mit und ohne Kristallwasser entstehen können. Calciumphosphate finden ihre Verwendung u.a. als Knochenersatzmaterial, da sie im Körper als anorganischem Teil des Knochens die Stabilität und Belastbarkeit steuern. Diese körpereigenen Substanzen können verwendet werden, um die Biokompatibilität verschiedener Implantate durch eine Calciumphosphat-Beschichtung zu verbessern. So können sie auf Implantate aufgetragen werden, wie z. B. Endoprothesen für Hüftgelenke, Schrauben, Platten oder Schienen. Weiterhin können sie auch als biodegradierbare Zemente oder Keramiken verwendet werden.

Die Löslichkeit von Calciumphosphat ist vom pH-Wert abhängig. Generell kann die Aussage getroffen werden, dass die Löslichkeit mit steigendem pH-Wert abnimmt. Dies gilt zum Beispiel für Octacalciumphosphat (OCP), Tricalciumphosphat (TCP) und Hydroxylapatit (HAP). In Tabelle 1 sind die Summenformeln, die Löslichkeit, das molare Calcium- zu Phosphatverhältnis und die medizinische Anwendung verschiedener Calciumphosphate aufgeführt^[38].

Tabelle 1 - Daten zu verschiedenen Calciumphosphaten^[38]

Verschiedene Daten zu einigen ausgewählten Calciumphosphaten				
Name	Summenformel	Löslichkeits- produkt bei 25°C [-log(K_{sp})]	molares Ca/P Verhältnis	Verwendung in der Medizin u.a. als
Monocalciumphosphat- Monohydrat (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,14	0,5	Calciumphosphat- Zement
Dicalciumphosphat- Dihydrat, Brushit (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	6,59	1,0	
Dicalciumphosphat- Anhydrat (DCPA)	CaHPO_4	6,59	1,0	
Monocalciumphosphat- Anhydrat (MCPA)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	1,14	0,5	-
Octacalciumphosphat (OCP)	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4$ $\cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	96,6	1,33	Knochenersatz- material, biokompatible Beschichtung von Metallteilen
Hydroxylapatit (HAP)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	116,8	1,67	
Amorphes Calciumphosphat (ACP)	$\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot n \text{H}_2\text{O}$	25-33	1,22-2,5	
α -Tricalciumphosphat (α -TCP)	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	25,6	1,5	Calciumphosphat- Zement
β -Tricalciumphosphat (β -TCP)	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	28,9	1,5	Knochen- ersatzmaterial

3.3 Aminosäuren und Polyaminosäuren

Die Aminosäuren stellen den kleinsten Baustein der Proteine dar und spielen somit eine sehr wichtige Rolle im Aufbau aller Lebewesen. Im Proteinhaushalt des Menschen gibt es eine Fülle von Aminosäuren, wobei 20 bestimmte, so genannte α -Aminosäuren am häufigsten vertreten sind. Dieses Kapitel soll sich ausschließlich mit den Standardaminosäuren befassen. Die nachfolgende Tabelle 2 zeigt diese 20 wichtigsten Aminosäuren nach ihrer Häufigkeit in Proteinen sortiert. Aminosäuren mit einer *unpolaren Seitenkette* werden *kursiv*, **polare, ungeladene Seitenketten fett** und polare, geladene Seitenketten unterstrichen dargestellt.

Tabelle 2 - Die 20 häufigsten Aminosäuren^[39]

Die 20 häufigsten Aminosäuren und ihre allgemeinen wichtigen Daten					
Name	Dreibuchstaben-Code	durchschnittliche Häufigkeit in Proteinen	pK _a der α -COOH	pK _a der α -NH ₃ ⁺	pK _a der Seitenkette
<i>Leucin</i>	<i>Leu</i>	9,1%	2,33	9,74	
<i>Alanin</i>	<i>Ala</i>	7,8%	2,35	9,87	
<i>Glycin</i>	<i>Gly</i>	7,2%	2,35	9,78	
<i>Valin</i>	<i>Val</i>	6,6%	2,29	9,74	
<i>Isoleucin</i>	<i>Ile</i>	5,3%	2,32	9,76	
<i>Prolin</i>	<i>Pro</i>	5,2%	1,95	10,64	
<i>Phenylalanin</i>	<i>Phe</i>	3,9%	2,20	9,31	
<i>Methionin</i>	<i>Met</i>	2,2%	2,13	9,28	
<i>Tryptophan</i>	<i>Trp</i>	1,4%	2,46	9,41	
Serin	Ser	6,8%	2,19	9,21	
Threonin	Thr	5,9%	2,09	9,10	
Asparagin	Asn	4,3%	2,14	8,72	
Glutamin	Gln	4,3%	2,17	9,13	
Tyrosin	Tyr	3,2%	2,20	9,21	10,46
Cystein	Cys	1,9%	1,92	10,70	8,37
<u>Glutaminsäure</u>	<u>Glu</u>	<u>6,3%</u>	<u>2,10</u>	<u>9,47</u>	<u>4,07</u>
<u>Lysin</u>	<u>Lys</u>	<u>5,9%</u>	<u>2,16</u>	<u>9,06</u>	<u>10,54</u>
<u>Asparaginsäure</u>	<u>Asp</u>	<u>5,3%</u>	<u>1,99</u>	<u>9,90</u>	<u>3,90</u>
<u>Arginin</u>	<u>Arg</u>	<u>5,1%</u>	<u>1,82</u>	<u>8,99</u>	<u>12,48</u>
<u>Histidin</u>	<u>His</u>	<u>2,3%</u>	<u>1,80</u>	<u>9,33</u>	<u>6,04</u>

Einige dieser Aminosäuren können im menschlichen Körper synthetisiert werden. Andere sind essentiell, was bedeutet, dass sie nicht im Körper gebildet werden können und daher über die Nahrung aufgenommen werden müssen. α -Aminosäuren bestehen aus einem bei allen Aminosäuren gleichen Teil und der Seitenkette, die sie unterscheidet. Dieser identische Teil besteht aus einem Kohlenstoff, an dessen α -Position eine NH_2 -, eine COOH -Gruppe und ein Wasserstoffatom sitzen. Die vierte Position bildet die Seitenkette (R). Abbildung 3.1 zeigt diese allgemeine Struktur.

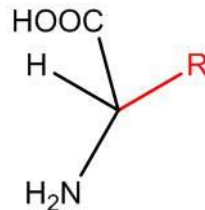


Abbildung 3.1 - Darstellung der allgemeinen Struktur einer Aminosäure^[39]

Die Amino- und Carboxylgruppen ionisieren leicht und bilden dann Zwitterionen, da die NH_3^+ - und COO^- -Gruppe entgegengesetzt geladen vorliegen. Über die Eliminierung von Wasser können alle Aminosäuren Peptidbindungen bilden und so aneinander kondensieren. Abbildung 3.2 zeigt diese einfache, aber sehr wichtige Reaktion. Die roten Bindungen heben die für die Reaktion wichtigen Bindungen hervor.

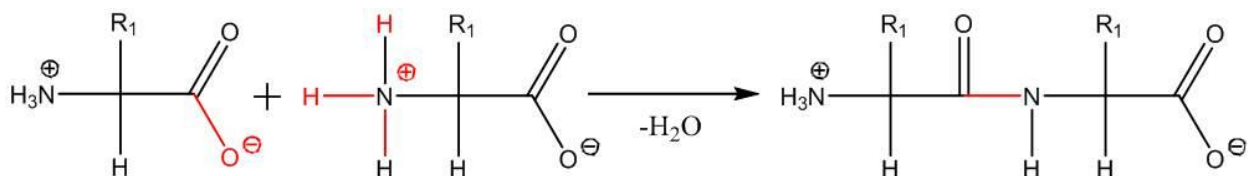


Abbildung 3.2 - Darstellung der Kondensation zweier Aminosäuren unter Ausbildung der Peptidbindung^[39]

In Abbildung 3.2 kann anhand des Produktes der N-Terminus (oder Aminoterminus) erklärt werden, welcher den freien NH_3^+ -Rest der Aminosäure darstellt. Der C-Terminus (Carboxyterminus) steht für den freien Carboxylrest. Die Kondensation einer weiteren Aminosäure an das Produkt aus Abbildung 3.2 kann jetzt über den N-Terminus der neuen Aminosäure an den C-Terminus des Produktes erfolgen. Die Reaktion kann auch umgekehrt erfolgen, so dass auch die neue Aminosäure mit dem C-Terminus an den N-Terminus des Produktes kondensiert^[39]. Eine Polyaminosäure stellt ein Polymer aus einer bestimmten Aminosäure dar. Alle Seitenketten der Polyaminosäure sind identisch.

Die Seitenketten können wie bei Polymeren auch in bestimmten Motiven angeordnet sein, z.B. AB (alternierend), AAABBB (Block-Polymer) oder ABBABABBABABAAB (unspezifisch) sein. Ist diese Seitenkette geladen, so kann die Polyaminosäure auch als Polyelektrolyt bezeichnet werden.

3.3.1 Polyasparaginsäure

Die Asparaginsäure (Asp) ist das Monomer der Polyasparaginsäure und gehört unter den 20 wichtigsten Aminosäuren zu der Gruppe mit geladenen polaren Seitenketten.

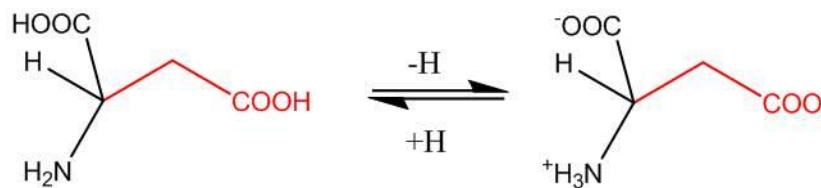
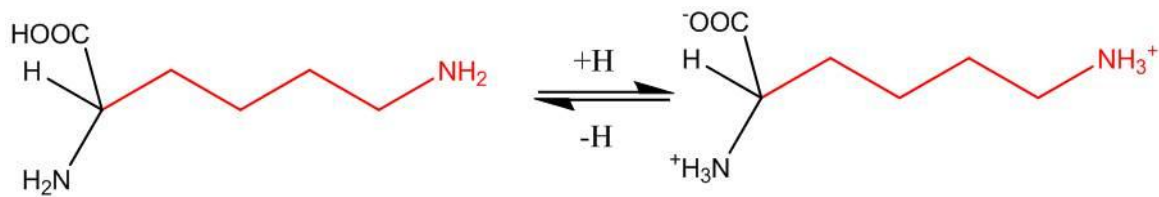


Abbildung 3.3 - Asparaginsäure^[39]

Die Monomereinheit (Abbildung 3.3) hat eine Molmasse von $115,1 \text{ g mol}^{-1}$, und die pKa-Werte der Aminosäure liegen für die α -Carbonsäure-Gruppe bei pKa_1 : 1,99 und die der α -Amino-Gruppe bei pKa_2 : 9,90. Die funktionelle β -Carbonsäuregruppe der Seitenkette hat einen pKa-Wert von 3,90. Die Asparaginsäure reagiert in Wasser sauer, trägt bei pH-Werten über 3 eine negative Ladung, und zählt neben Lysin und Arginin zu den hydrophilsten Aminosäuren. Dieser Umstand ist für eine Anwendung in wässriger Lösung sehr interessant. Im menschlichen Organismus wird diese Aminosäure direkt im Citrat-Zyklus abgebaut und so zur Energiegewinnung genutzt. Wird die Polyaminosäure im Körper abgebaut, so entstehen Abbauprodukte, die vollständig metabolisiert werden können, so dass keine gesundheitlichen Risiken bestehen^[39].

3.3.2 Polylysin

Das Lysin (Lys) ist das Monomer des Polylysins und gehört unter den 20 wichtigsten Aminosäuren wie Asparaginsäure zu der Gruppe mit geladenen polaren Seitenketten. Die Monomereinheit (Abbildung 3.4) hat eine Molmasse von $128,2 \text{ g mol}^{-1}$ und die pKa-Werte der Aminosäure liegen für die α -Carbonsäure-Gruppe bei pKa_1 : 2,16 und die der α -Amino-Gruppe bei pKa_2 : 9,06.

**Abbildung 3.4 - Lysin^[39]**

Die funktionelle ϵ -Amino-Gruppe der Seitenkette hat einen pKa-Wert von 10,54. Diese basische Aminosäure trägt bei pH-Werten über 10 eine positive Ladung, bei einem physiologischen pH-Wert ist sie allerdings ungeladen. Nur Histidin weist bei pH 6 bereits eine Ladung auf. Lysin zählt neben der Asparaginsäure und dem Arginin zu den hydrophilsten Aminosäuren, was sie für Anwendungen in wässriger Lösung ebenfalls interessant macht. Analog zur Asparaginsäure wird Lysin ebenfalls im Citrat-Zyklus metabolisiert. Bevor diese Aminosäure in den Citrat-Zyklus gelangen kann, muss sie in Acetyl-CoA umgewandelt werden. Dies stellt jedoch keine Besonderheit dar, sondern ist ein normaler Abbau bzw. Umwandlungsweg, wie ihn andere Aminosäuren auch durchlaufen^[39].

3.4 Proteine

Proteine sind die Bausteine vieler biologischer Systeme und besitzen mannigfaltige Strukturen und Funktionen. Sie dienen für viele Stoffe wie z.B. Sauerstoff, CO₂ und Fette als Transportmoleküle. Wirken sie bei chemischen Reaktionen als Katalysatoren, so werden sie Enzyme genannt. Im Immunsystem haben sie ebenfalls spezielle Aufgaben, u.a. als Antikörper, des Weiteren markieren sie Zellen, bilden dort auch Identifikationsstrukturen aus oder bilden Muskelsysteme. Weiterhin steuern sie z.B. Knochen-, Schalen-, Stachel- und Knorpelaufbau bzw. -abbau. Dies ist nur ein kleiner Ausschnitt aus dem breiten Vorkommen von Proteinen in der Natur. Proteine erfüllen zahlreiche komplexe Funktionen im Biometabolismus. Aufgrund ihrer großen Bedeutung für den Organismus muss eine fehlerfreie Funktion der Proteine gewährleistet sein. So existiert ein komplexes Struktursystem, welches Erkennung und Abbau fehlerhafter Proteine ermöglicht. Geschichtlich betrachtet gingen Wissenschaftler vor dem Jahre 1934 davon aus, dass Proteine Kolloide ohne geordnete Struktur sind. Ihre enzymatische Aktivität wurde auf unbekannte Komponenten zurückgeführt. 1934 konnten aber J.D. Bernal und D. Crowfoot Hodgkin über Beugungsmuster von

Röntgenstrahlen anhand von Pepsin erste Beweise finden, dass Proteine große strukturierte Moleküle darstellen. 1958 wurde die erste Röntgenstruktur eines Proteins bestimmt. J. Kendrew untersuchte damals mit seinen Mitarbeitern das Pottwal-Myoglobin. Heute wird die Struktur von Proteinen in vier Abschnitte unterteilt, welche in Abbildung 3.5 dargestellt sind.

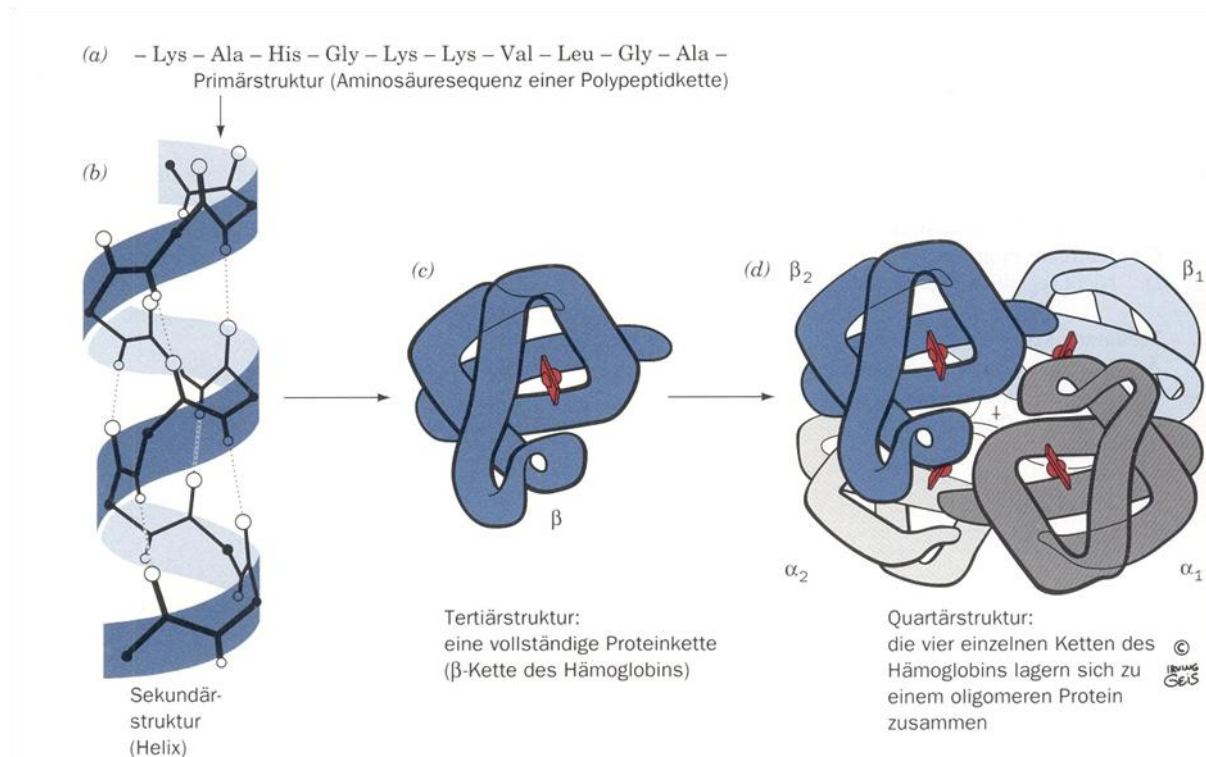


Abbildung 3.5 - Strukturelle Organisationsebenen von Proteinen anhand des Hämoglobins^[39]

3.4.1 Die Primärstruktur

Proteine sind aus verschiedenen Aminosäuren aufgebaut. Diese Aminosäure-Sequenz ist für jedes Protein spezifisch und wird als Primärstruktur bezeichnet. Die Aminosäuresequenz bestimmt die Funktion des Proteins und legt die chemischen Parameter wie Puffer-Fähigkeit, Ladung und Abstoßung bzw. Anziehung der Kettenteile fest.

3.4.2 Die Sekundärstruktur

Die Sekundärstruktur beschreibt eine lokale räumliche Anordnung des Peptidgerüsts ohne Berücksichtigung der Konformation der Seitenketten. Diese kann unter anderem ausschlaggebend sein für die Wahl des antiparallelen oder parallelen β -Faltblattes. Es sollten in diesem Zusammenhang die beiden wichtigsten Vertreter erwähnt werden: Die

α -Helix, dargestellt in Abbildung 3.6 (links), wurde 1951 von L. Pauling vorgeschlagen. Sie liegt fast immer in der rechtsgängigen Variante vor und hat auf 3,6 Reste pro Windung eine Ganghöhe (Abstand der Helix-Ebene) von 0,54 nm. Eine Helix aus 12 Aminosäuren hat also fast drei Windungen. Die gestrichelten Linien in Abbildung 3.6 (links) stellen die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen C=O- und N-H-Gruppen dar^[39].

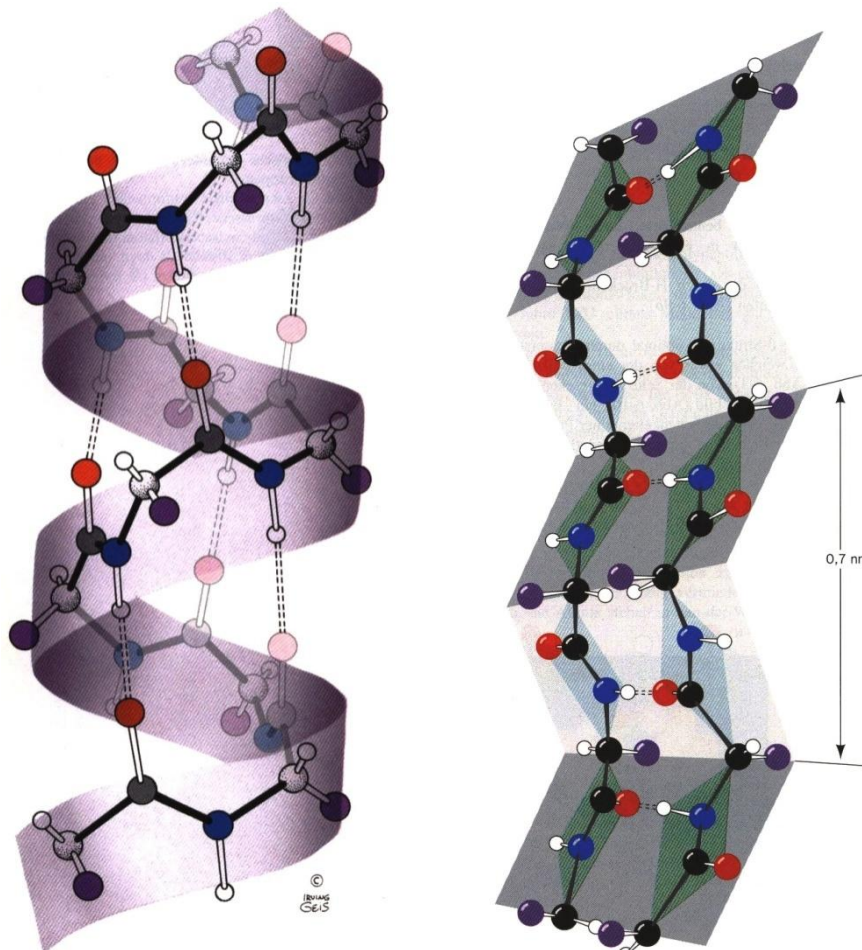


Abbildung 3.6 - Darstellung einer α -Helix (links) und eines β -Faltblattes (rechts)^[39]

Diese Wasserstoffbrückenbindungen liegen auf jeder vierten Atom-Position des Peptidrückgrats und haben mit einer Länge von 0,28 nm^[39] die nahezu ideale Länge für eine ungespannte, bestmögliche Wechselwirkung. Eine einzelne Wasserstoffbrückenbindung ist nicht stabiler als eine kovalente oder ionische Bindung, jedoch sind über ein Protein hunderte dieser Brückenbindungen möglich, und die Summe wirkt stabilisierend auf die Struktur des Proteins. Um die sterischen Hinderungen zu minimieren, ragen die Seitenketten entgegengesetzt zur Helix-Richtung nach außen und unten, außerdem ist die α -Helix dicht gepackt, wodurch die van-der-Waals-Kräfte optimal wirken können.

Das β -Faltblatt, dargestellt in Abbildung 3.6 (rechts), wurde von L. Pauling und R. Corey gemeinsam als zweite mögliche Sekundärstruktur von Polypeptiden vorgeschlagen. Sie kann antiparallel und parallel aufgebaut sein (Abbildung 3.7). In der antiparallelen Variante verlaufen die benachbarten Stränge, welche die Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, in entgegengesetzter Orientierung (Abbildung 3.7 a). Bei der parallelen Anordnung (Abbildung 3.7 b) liegen die beiden Stränge in derselben Richtung vor. Ein β -Faltblatt besteht in der Regel aus 2 bis 12 Peptidsträngen, im Durchschnitt 6. Jeder Strang kann aus bis zu 15 Aminosäuren aufgebaut sein, im Durchschnitt ebenfalls 6^[39].

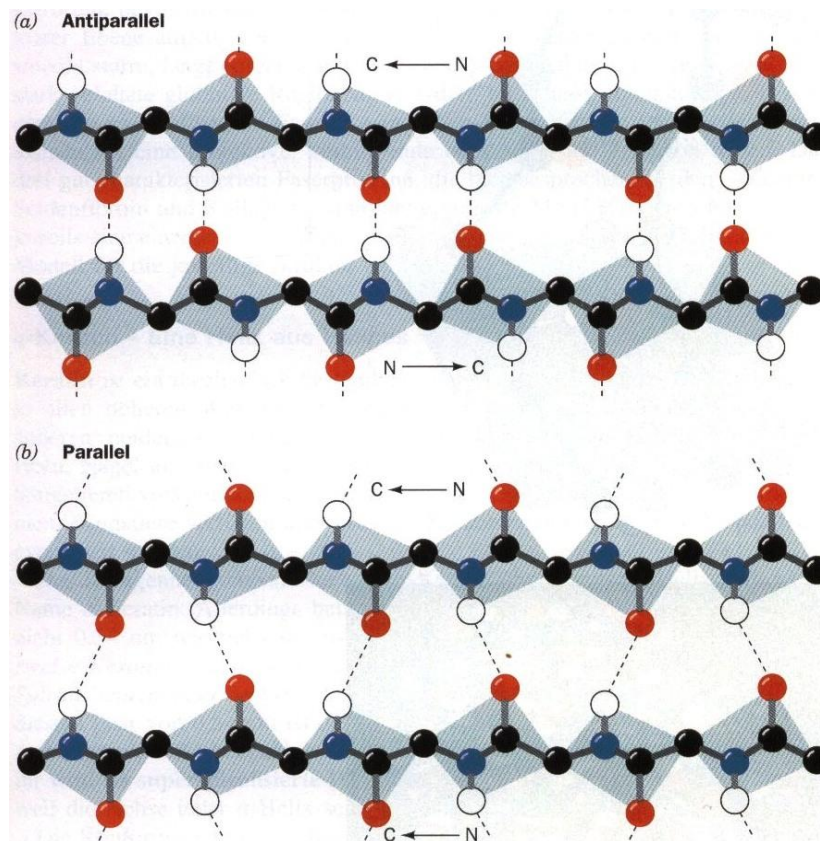


Abbildung 3.7 - Das β -Faltblatt (antiparallele und parallele Darstellung)^[39]

Eine weitere Form von Sekundärstrukturen ist die sogenannte Superhelix, aus der sich Protofilamente und Mikrofibrillen bilden. Sie lassen sich nicht streng in Sekundär- oder Tertiärstruktur einordnen. Neben den repetitiven Proteinstrukturen (α -Helix und β -Faltblatt) gibt es auch die sogenannten nicht repetitiven Strukturen^[39]. Diese sind nicht weniger geordnet als die Helices oder Faltblätter. Sie sind aber uneinheitlicher und schwieriger zu beschreiben.

Eine weitere Sekundärstruktur ist die β -Beule, welche ein verzerrtes β -Faltblatt mit weniger Wasserstoffbrückenbindungen darstellt. Kehren oder β -Schleifen verbinden oft

aufeinander folgende antiparallele β -Faltblätter miteinander. Eine sogenannte Ω -Schleife befindet sich oft auf der Proteinoberfläche und erhielt ihren Namen von ihrer Form, welche einem Omega gleicht. Sie spielen wahrscheinlich bei Erkennungsprozessen eine wichtige Rolle. Der Hohlraum innerhalb dieses Omegas wird durch die Seitenketten der Aminosäuren aufgefüllt^[39].

3.4.3 Die Tertiärstruktur

Die Tertiärstruktur eines Proteins beschreibt die Faltung der Sekundärstrukturen und legt genau fest, welche räumliche Position jedes einzelne Atom im Protein hat. Sie kann über Röntgenkristallographie oder Kernspinresonanzspektroskopie identifiziert werden. In Abbildung 3.8 werden einige tertiäre Struktur motive dargestellt. In der oberen Reihe von links nach rechts sind gezeigt: ein $\beta\alpha\beta$ -Motiv, eine β -Haarnadel-Schleife und ein $\alpha\alpha$ -Motiv. In der unteren Reihe zeigen die linken zwei Motive β -Fass-Strukturen, welche sich ausschließlich nur aus β -Faltblättern zusammensetzen. Die rechte Struktur ist auch eine Fass-Struktur, sie enthält jedoch α -Helices und wird daher α/β -Fass genannt. „Variationen in der Aminosäure-Sequenz ebenso wie in der Gesamtstruktur des gefalteten Proteins können die regulären Konformationen der Sekundärstrukturelemente verzerren“ ^[39]-S.148].

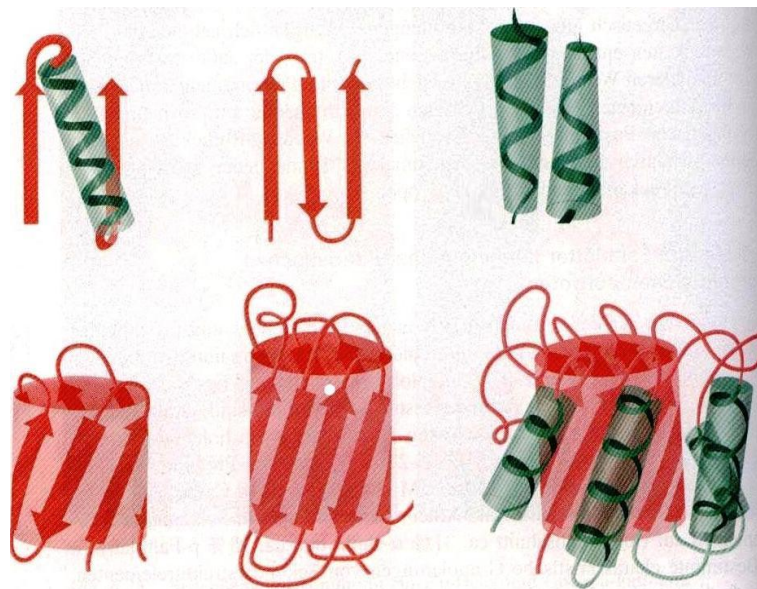


Abbildung 3.8 - Darstellung einiger Tertiärstruktur-Motive^[39]

So kann es zur Abweichung vom idealen β -Faltblatt oder von der α -Helix kommen, wenn die Aminosäure-Sequenz fehlerhaft aufgebaut wurde. Dies bedeutet, dass bei der Faltung der Sekundärstruktur die Tertiärstruktur nicht gebildet werden kann, weil die

entscheidende Aminosäure falsch ist. Folglich kann das Protein seine Aufgabe nicht erfüllen^[39]. Es kann beispielsweise von einem spezifischen Rezeptor nicht erkannt werden. Ein solches defektes Protein wird erkannt und kann sofort wieder abgebaut werden, bevor aus dem Fehler ein Problem für den Organismus entsteht. In Abbildung 3.9 und 3.10 werden die Tertiärstrukturen der verwendeten Proteine Ubiquitin und Lysozym dargestellt, welche sowohl β -Faltblätter als auch α -Helices besitzen.

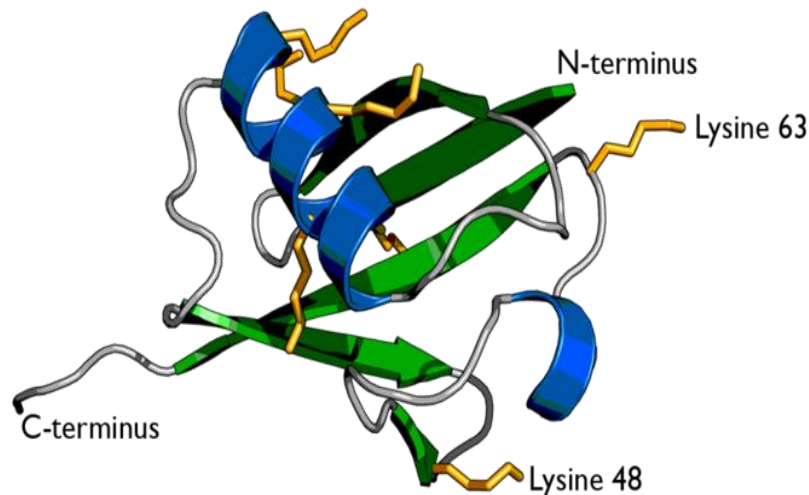


Abbildung 3.9 - Tertiärstruktur von Ubiquitin^[40]

Die Pfeile symbolisieren die Tertiärmotive, und die Pfeilrichtung zeigt den Verlauf der Aminosäure-Sequenz vom C-Terminus (Anfang) zum N-Terminus (Ende) hin an. In Abbildung 3.9 und 3.10 werden die Sekundärstrukturen der Proteine als farbliche Elemente dargestellt.

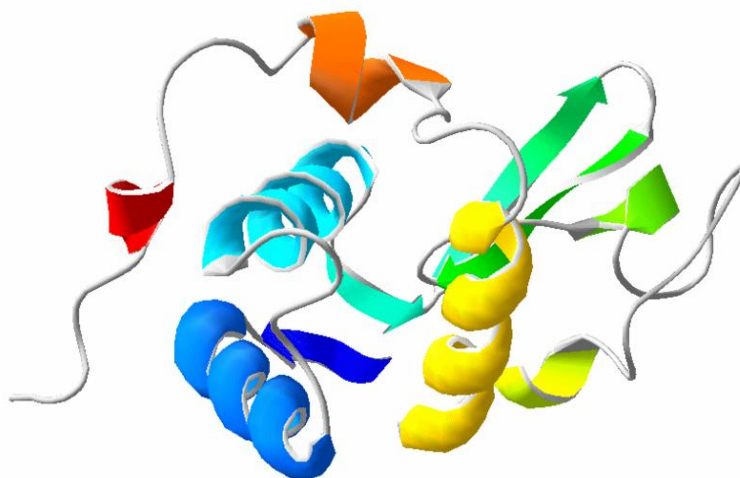


Abbildung 3.10 - Tertiärstruktur von Lysozym^[40]

Die weißen verbindenden Elemente dazwischen sind nicht spezifisch strukturierte Verbindungseinheiten. Ein Protein kann auch mehrere dieser dargestellten Polypeptid-untereinheiten besitzen.

3.4.4 Die Quartärstruktur^[39]

Assoziieren mehrere Polypeptiduntereinheiten miteinander, so bildet sich wiederum eine spezifische räumliche Anordnung dieser Strukturen aus. Dies wird als Quartärstruktur bezeichnet. Diese Systeme können dann leicht Molmassen von 100 kDa überschreiten. In Abbildung 3.11 (links) ist ein Hämoglobinmolekül dargestellt, welches strukturell in α -Untereinheiten (grüne und gelbe Bereiche), β -Untereinheiten (türkis und blau) und die Häm-Gruppe (rot) aufgeteilt werden kann. Proteinuntereinheiten assoziieren meistens über nicht kovalente Bindungen. Proteine, die aus mehreren Untereinheiten bestehen, werden als Oligomere bezeichnet. Bei der Faltung eines Proteins zu der aktiven oder inaktiven Form werden spezielle Faltungsmechanismen aktiviert. Ein bekanntes Beispiel sind die Disulfidbrücken bildenden Cysteinreste. Weiterhin sind auch Metall-Ionen für die Quervernetzung proteinaler Strukturen zuständig. Beispiele hierfür sind unter anderem das sogenannte Zinkfinger-Motiv, welches in Abbildung 3.11 (rechts) dargestellt wird. Bei der Ausbildung der möglichen 3D-Strukturen eines Proteins darf der hydrophobe Effekt der funktionellen, teilweise geladenen und nicht geladenen Gruppen nicht außer Acht gelassen werden. Er ist die Ursache für den geringstmöglichen Kontakt einer unpolaren Substanz mit Wasser und hat den größten Einfluss auf die native Proteinstruktur.

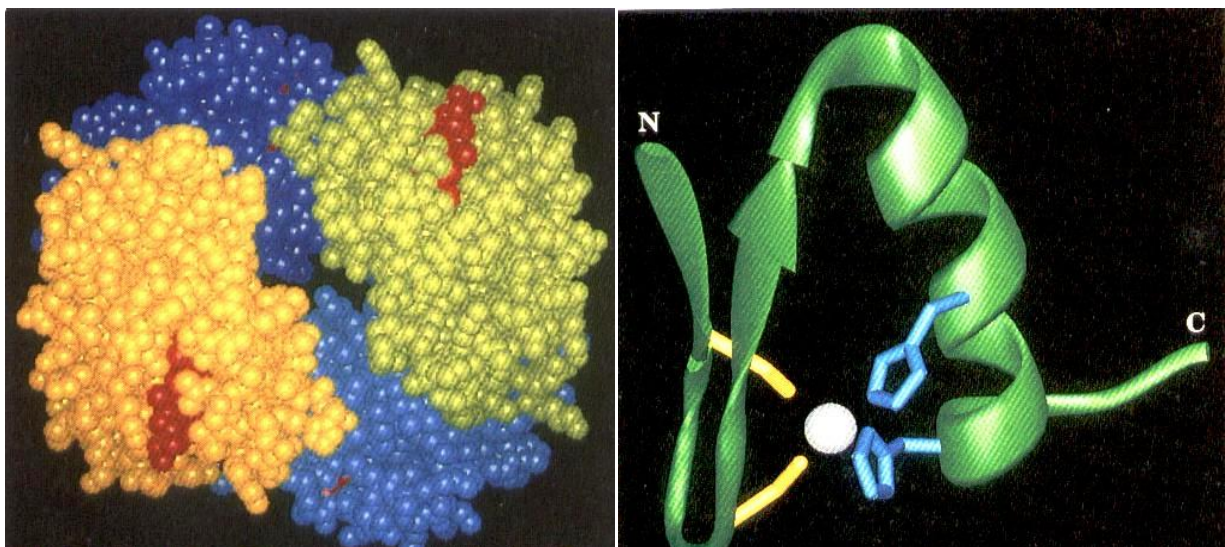


Abbildung 3.11 - Darstellung eines Hämoglobinmoleküls (links) und eines Zinkfinger-motives (rechts)^[39]

Mit zunehmender Hydrophobizität der Seitenkette nimmt die Wahrscheinlichkeit zu, dass diese sich im Innern des Proteins befindet. Die Hydrophobizität ist ein Indikator dafür, welche Polypeptidketten im Inneren vorliegen und welche sich an der Oberfläche befinden. Van-der-Waals-Kräfte haben über kurze Entfernungen im Innern einen wichtigen Einfluss auf die Stabilität des Proteins. Bei der Entfaltung des Proteins geht dieser Einfluss und damit die Funktionalität und Aktivität des Proteins verloren^[39]. Die Stabilität von Proteinen wird bedingt durch fünf wichtige Eigenschaften:

- Der pH-Wert: Proteine liegen im Körper meist in Puffersystemen vor, wodurch sie am effektivsten agieren können und die Denaturierung ein Minimum erreicht. Ist dies nicht der Fall, so kann es zum Zerfallen der Proteine mit anschließendem Abbau kommen.
- Die Temperatur hat auf die verschiedenen Proteine einen unterschiedlich starken Einfluss. Generell ist eine Temperatur von über 40 °C ungünstig, da dies zu einer verstärkten Denaturierung führt.
- Proteine können durch spezifische Enzyme abgebaut werden, z. B. durch Proteasen, welche ihre Peptidbindungen spalten.
- Adsorption an Oberflächen: Der Kontakt von Proteinen mit der Luft-Wasser-Grenze kann zur Denaturierung führen. Daher sollten die Lösungen möglichst konzentriert vorliegen, um die Menge an Protein, die mit der Luft in Kontakt kommt, möglichst gering zu halten. Des Weiteren hat ein kleines Volumen auch eine kleine Kontaktfläche, was ebenfalls den Kontakt mit der Luft verringern würde.
- Ein nicht zu unterschätzender Effekt ist die langsame Oxidation und mikrobakterielle Dekontamination. Proteinlösungen sollten daher bei -196 °C in flüssigem N₂ oder bei -78 °C auf Trockeneis bzw. in speziellen Kühlschränken gelagert werden.

3.4.5 (Bovines) Serum-Albumin^[39,41]

Das Albumin ist ein globuläres Protein mit einer Aminosäurekette, die 583-590 Aminosäuren umfassen kann, welches zu einer Molekülmasse von ca. 66 kDa führt. BSA ist ein Gemisch von im Blut vorkommenden Proteinen. Die Molekülmasse liegt daher zwischen 100 und 300 kDa. Eine Größe des Proteins ist daher genau nicht zu bestimmen. Aufgrund der Molekülmasse kann eine Größe von 10 bis 20 nm angenommen werden. Auffällig für Albumine ist ein hoher Schwefelanteil, da diese Klasse üblicherweise reich an Cystein ist. Des Weiteren ist eine Löslichkeit von Albumin in Wasser problemlos möglich: Das Vorkommen im menschlichen Blutserum liegt bei

35-50 g L⁻¹ und der Isoelektrische Punkt liegt bei pH 4,6. Albumin steuert die Wasseraufnahme und -abgabe in das Gewebe eines vertebralen Organismus, folglich dient es der Aufrechterhaltung und Steuerung des kolloidosmotischen Druckes. Außerdem transportiert Albumin auch zahlreiche nicht wasserlösliche Stoffe wie Fettsäuren, Vitamine, Hormone und Pharmaprodukte über die Blutgefäße durch den gesamten Organismus. Dabei können z.B. 20-25 Bilirubin-Moleküle, 9 Stearinsäure-Moleküle oder 5 Salicylsäure-Moleküle an ein einzelnes Albuminmolekül gebunden werden. Nebenbei wirkt es auch als Puffersubstanz für Protonen im Blut, wobei jedoch das Hydrogencarbonat für diese Aufgabe von wesentlich größerer Bedeutung ist. Chemisch interessante Vorkommen zur Herstellung dieser Proteinsorte sind Kuhmilch und Hühnereier, sowie Kälber, aus deren Blut das Protein isoliert werden kann.

3.4.6 Ubiquitin^[39,42]

Ubiquitin ist ein kleines Protein, welches aus 76 Aminosäuren aufgebaut ist. Die Molekülmasse liegt bei ca. 8 kDa und ein Protein ist ca. 1,3 nm groß (globulär betrachtet). Sein Name leitet sich, aufgrund seiner Allgegenwärtigkeit und Häufigkeit, aus dem Lateinischen *ubiquitär* = *überall verbreitet*, ab. Die Funktion des Proteins besteht in der Markierung von abzubauenen Proteinen. Hierzu wird Ubiquitin kovalent über eine dreistufige Reaktion gebunden. Es ist üblich, dass sich mehrere (bis zu 50) Ubiquitin-Moleküle an das Zielprotein anlagern. Wie bei den Polyaminosäuren ist auch hier erkennbar, dass ein Freisetzen von Ubiquitin im Körper keine negativen Auswirkungen hat, wenn eine körpereigene Substanz dem Körper zugeführt wird^[39].

3.4.7 Lysozym

Lysozym wurde 1965 von D. Phillips sehr ausführlich untersucht. Er befasste sich besonders mit dem in dieser Arbeit verwendeten Lysozym, welches aus Hühnereiweiß gewonnen wird. Die 129 Aminosäuren führen zu einer Molekülmasse von ~14,6 kDa. Die Größe eines globulären Proteinkörpers würde hier bei ~2,5 nm liegen. Dieses eher kleine Protein ist über vier Disulfid-Brücken quervernetzt und bildet fünf helicale Segmente sowie ein dreisträngiges β -Faltblatt. Die meisten unpolaren Seitenketten des Proteins befinden sich innerhalb des Moleküls ohne Kontakt zum wässrigen Medium. Es wirkt als Bakterizid und kann zur Beseitigung von abgetöteten Bakterien beitragen. Zudem ist es in der Lage, bakterielle Zellwände zu zerstören sowie Chitin aufzulösen. Dieses ist ein Zellwandbestandteil von Pilzen und der Hauptbestandteil des Exoskelettes von Insekten und Krustentieren. Bakterienzellwände werden über die

Hydrolyse von Peptidglykanen zerstört. Dies bedeutet, dass glykosidische $\beta(1\rightarrow4)$ -Bindungen zwischen *N*-Acetylmuraminsäure und *N*-Acetylglucosamin gespalten werden. D. Phillips postulierte einen vier Stufenprozess bei der enzymatischen Wirkung des Proteins. Lysozym ist in Wirbeltieren weit verbreitet, kommt in Zellen und Sekreten vor und beschleunigt diese Hydrolyse um den Faktor 10^8 gegenüber einer nicht-katalysierten Hydrolyse^[39].

3.5 Lipide und Tetraetherlipide aus hyperthermophilen Archaea

Hier sollen kurz Lipide und ihre Eigenschaften beschrieben werden. Der Schwerpunkt des Kapitels soll aber auf den Eigenschaften und der Herstellung der verwendeten Tetraetherlipide liegen.

3.5.1 Allgemeines zu Lipiden

Lipide bestehen aus einem geladenen Ende (Kopf) und einer unpolaren, also hydrophoben bzw. lipophoben Kette (Schwanz). Sie sind in den Zellen für das Erstellen der Membranschichten zuständig. Hierzu lagern sich zwei Lipide mit den Schwänzen aneinander, so dass die polaren Köpfe in das wässrige Medium, das die Zellen umgibt, zeigen. Die Löslichkeit von Lipiden in Wasser ist aufgrund der hydrophoben Kette sehr gering. Die polare Kopfgruppe kann den Effekt nicht kompensieren. Also sind die Lipide in wässriger Lösung gezwungen, Mizellen o.ä. auszubilden (Abbildung 3.12).

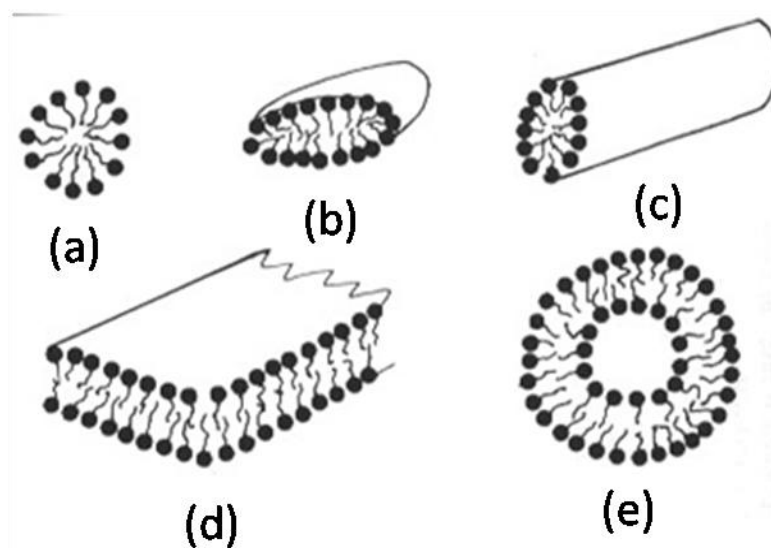


Abbildung 3.12 - Verschiedene Mizellentypen^[35]

In einem polaren Lösungsmittel wie Wasser verknüpfen sich üblicherweise die hydrophoben Ketten in vielen verschiedenen Variationen mit einer zweiten Kette, welche am Ende ebenfalls einen geladenen Kopf hat. So werden die ungeladenen Ketten „im Inneren gehalten“, und die geladenen Kopfgruppen nutzen die Polarität des Lösungsmittels. Um diese hydrophoben Ketten können sich z.B. Sphingolipide oder Cholesterin ansammeln. Werden Lipide zur Stabilisierung von Calciumphosphat-Nanopartikeln verwendet, so besteht das Problem, dass die geladene Kopfgruppe zum Partikel zeigt, d.h. der ungeladene Schwanz ins Wasser ragt. Dies ist für die Stabilisierung eine ungünstige Voraussetzung, die ein Tetraetherlipid (s.u.) mit seinen zwei polaren Enden umgehen kann.

3.5.2 Allgemeines zu Tetraetherlipiden aus hyperthermophilen Archaea^[43-57]

Hyperthermophile Bakterien leben in einer extremen Umgebung, da ihr Wachstumsoptimum meist bei über 80 °C liegt. Sinkt die Umgebungstemperatur auf unter 60 °C ab, können folglich die meisten Bakterien dieser Art nicht mehr wachsen. Typische Lebensräume dieser Art sind Vulkangebiete, Geysire, terrestrische Sulfataren auch „hyper-Salinen“ genannt und unterseeische Tiefsee-Hydrothermalquellen, auch *Black Smoker* genannt. Diese können Wassertemperaturen von bis zu 110 °C erreichen. Die Lebensräume zeichnen sich generell durch hohe Umgebungstemperaturen und Anoxizität aus. Manche Umgebung verfügt zusätzlich noch über hohe Salzkonzentrationen und extreme pH-Werte (z.B. Sulfatare). Ein Leben in solcher Umgebung erfordert eine hohe Stabilität der Zellwände gegenüber oxidativen und hydrolytischen Einflüssen. So ist die Membran dieser Arten um ein Vielfaches beständiger als die Lipid-Membran von eukaryontischen Zellen^[58]. Um die DNA dieser Spezies zu schützen, weisen sie neben einem sehr hohen Guanin und Cytosin-Basenpaar (GC-Basenpaar)-Gehalt weitgehend unbekannte Basenmodifikationen auf^[40]. Das GC-Basenpaar bildet drei Wasserstoffbrückenbindungen aus, während das Adenin und Thymin-Basenpaar nur zwei Wasserstoffbrückenbindungen ausbildet. Die Temperaturbeständigkeit der üblichen DNA ist daher nicht so hoch, was sich durch eine niedrigere Schmelztemperatur der DNA bemerkbar macht.

3 Theoretische Grundlagen

3.5 Lipide und Tetraetherlipide aus hyperthermophilen Archaea

Tabelle 3 - Stoffwechselreaktionen der hyperthermophilen Archaea^[40]

Stoffwechselreaktionen der hyperthermophilen Archaea	
Energieliefernde Reaktion	Optimale Temperatur
$4 \text{ H}_2 + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow \text{H}_2\text{S} + 4 \text{ H}_2\text{O}$	83 bis 100 °C
$4 \text{ H}_2 + \text{HNO}_3 \rightarrow \text{NH}_4^+ + 4 \text{ H}_2\text{O}$	105 °C
$4 \text{ H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{ H}_2\text{O}$	88 bis 100 °C
Org. Verbindungen + S \rightarrow 2 H ₂ S + CO ₂	85 bis 88 °C
Org. Verbindungen + O ₂ \rightarrow H ₂ O + CO ₂	80 °C

In Tabelle 3 werden einige ausgewählte Stoffwechselreaktionen diverser hyperthermophiler Archaeaspezies gezeigt. Sie zeigen die Besonderheiten des Stoffwechsels der hyperthermophilen Archaea. In den extremen Lebensbedingungen dienen den hyperthermophilen Bakterien Schwefelverbindungen wie H₂SO₄ als Energiequellen und liefern die Elemente Wasserstoff und Kohlenstoff (aus CO₂), welche auch für diese Bakterien lebenswichtig sind. Unter anaeroben Bedingungen wird meistens Schwefel zu Schwefelwasserstoff reduziert. Sind aerobe Bedingungen gegeben, kann der Schwefelwasserstoff bis zur Schwefelsäure oxidiert werden.

Im Allgemeinen sind Lipide aus einem Glycerol-Rest aufgebaut, der mit Fettsäuren verestert ist. Ein Tetraetherlipid-Molekül stellt eine Fusion aus zwei Lipiden dar, welche an der hydrophoben Kette verschmolzen wurden. Diese Membran durchspannende, meist bipolare Monoschicht besitzt eine chemische, biologische und thermische Stabilität, die weder toxisch noch mutagen wirkt. Ein Tetraetherlipid besitzt anstatt einer Fettsäure ein unpolares C₂₀-C₄₀ Isopreneinheiten-Gerüst, welches über eine Ether- oder Nonitol-Brücke mit dem Glycerol verbunden ist. Typischerweise haben die Ketten eine Länge zwischen C₁₄-C₂₄, am häufigsten kommen die C₂₀- und C_{18/16}-Ketten vor^[59-61]. Abbildung 3.13 zeigt ein einfaches Tetraetherlipidgerüst ohne weitere funktionelle Gruppen.

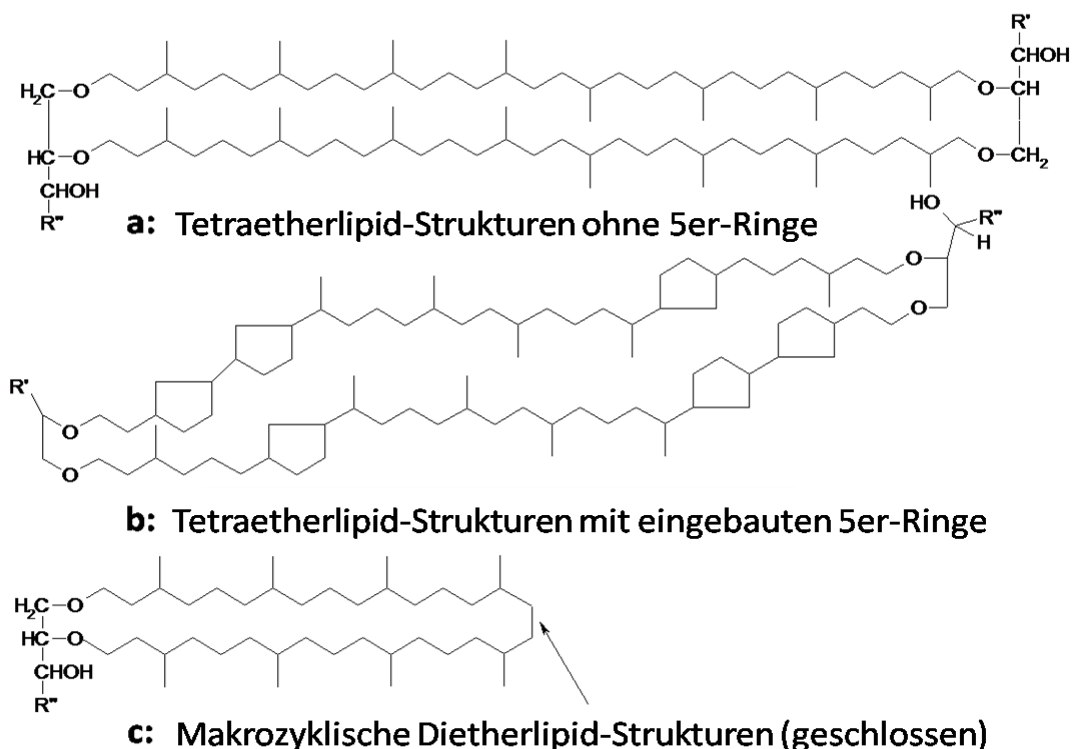


Abbildung 3.13 - Darstellung der Strukturen von Di- und Tetraetherlipiden^[62]

Der Tetraetherlipid des *Sulfolobus solfataricus* hat primär zwei C_{20} -Ketten zwischen den vier Etherbrücken ähnlich wie in Abbildung 3.13 a. Der Rest R' ist hier ein Zucker (siehe Kapitel 4.3.) und $R''=H$, was zum Namen Glycerol-Dialkyl-Nonitol-Tetraether (GDNT) führt. Die Isoprenkette zwischen den Etherbrücken kann bis zu acht 5er-Ringe ausbilden (Abbildung 3.13 b), was auch für das GDNT gilt. Es wurde von J. L. Gabriel et. al^[63] festgestellt, dass ein GDNT Molekül ohne 5er-Ringe eine C_{20} -Kettenlänge von 42,7 Å besitzt. Verfügt das GDNT über acht 5er-Ringe, ist diese Kette nur noch 33,9 Å lang. Ähnliches gilt für die Membrandicke einer solchen Schicht. Ohne 5er Ringe ist diese 62,7 Å breit, mit acht 5er-Ringen 45,8 Å^[63]. Eine weitere wichtige Information über die 5er-Ringe in der Seitenkette des Lipides ist, dass die Ringe nicht symmetrisch verteilt sein müssen. Eine Kette kann auch eine unterschiedliche Anzahl an 5er-Ringen zur Nachbarkette aufweisen. Weiterhin **kann** die α -Isopreneinheit den ersten 5er-Ring ausbilden, dies kann aber auch erst durch die β -Isopreneinheit erfolgen.

Eine Funktionalisierung der Isopreneinheiten ist ebenfalls denkbar, aber diese erfolgt meist am tertiären Kohlenstoff der Isopreneinheit. Dort wird das H-Atom durch eine OH-Gruppe ersetzt. Überraschend ist dies nicht, da eine Funktionalisierung der Kohlenstoffe, die den 5er-Ring bilden, eine sterische Veränderung nach sich ziehen würde. Die polaren Kopfgruppen können mannigfaltig modifiziert werden, was eine

breite Masse von Anwendungen ermöglicht ^[58,63]. In einigen Bakterientypen kommen neben den Tetraetherlipiden sogenannte Dietherstrukturen vor^[64]. Diese bestehen aus einem halben Tetraetherlipid, das nach der 4. Isopreneinheit endet (Abbildung 3.13 c)^[43,60,65]. Diese Dietherlipide können dann offen oder geschlossen als Makrocyclus vorliegen.

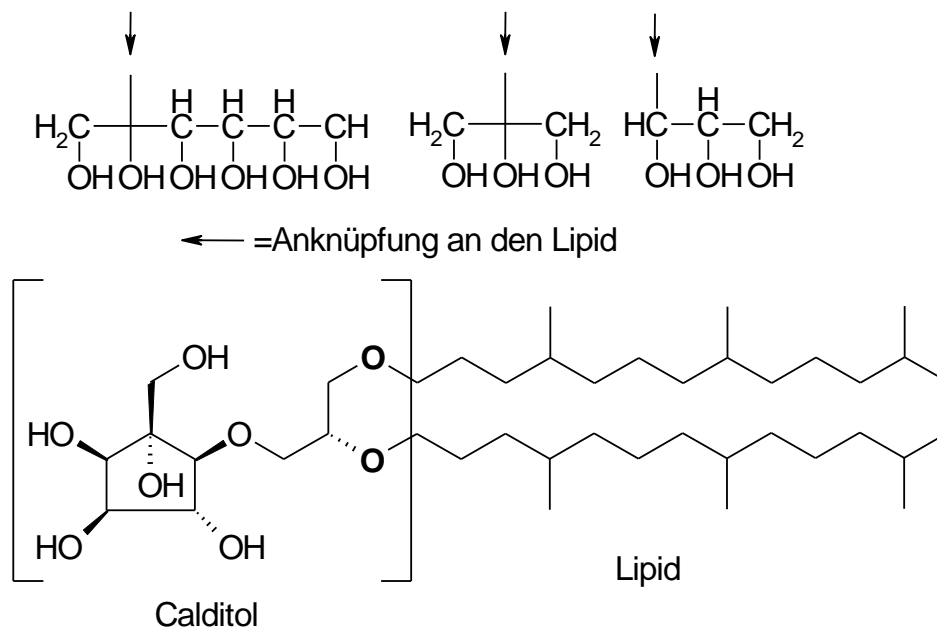


Abbildung 3.14 - Verschiedene Gruppen für R' und R'' von Tetraetherlipiden

Manche Tetraetherlipide haben auch als R' eine Phosphatgruppe und als R'' einen Zuckerrest vorliegen, wie das in den Versuchen verwendete Lipid^[58]. Es können für R' und R'' aber auch komplexere Strukturen an das Tetraetherlipid-Gerüst angebaut sein, wie es beispielsweise in Abbildung 3.14 dargestellt ist^[43,62,66].

3.5.3 Tetraetherlipide aus *Thermoplasma acidophilum*

In dieser Arbeit wurden Lipide vom Bakterienstamm *Thermoplasma acidophilum* (selten auch als *Calderiella acidophila* bezeichnet) verwendet. Die Art der Bakterie war der *Sulfolobus solfataricus*, welche aerob und anaerob leben können. Diese Art hat ein pH-Optimum von 2-3, während ihr Wachstum bei 55 °C optimal verläuft, was für diese hyperthermophile Art eine sehr niedrige Wachstumstemperatur darstellt. Natürliche Kolonien dieser Art existieren z.B. in schwelenden Kohlehalden. Dort dienen Pyrit und organische Kohlekomponenten als Energie- und Kohlenstoffquellen. Die äußere Zellwand der Bakterien besteht nicht, wie für Bakterien üblich, aus Peptidoglycanen,

sondern nur aus einer Plasmamembran, die aus Tetraetherlipiden und Lipooligosacchariden (Lipoglykanen) aufgebaut ist.

Variationen in der Seitenkette sind, speziell auf die Anzahl der Fünf-Ringe bezogen, temperaturabhängig. Üblicherweise beinhalten diese Bakterien in ihrer Membran ein Lipid, das zwei C₂₀-starke Ketten zwischen den Ether-Brücken besitzt, die ein bis vier 5er-Ringe enthalten (90-95 % des enthaltenen Lipids). 5-10 % sind üblicherweise die in Abbildung 3.13c (weiter oben) dargestellten Dietherlipide^[65]. Wird die Wachstumstemperatur der Bakterien auf 75-89 °C erhöht, so kommt es zu einer höheren Anzahl ausgebildeter 5er-Ringe. Es können sechs bis acht 5er-Ringe gebildet werden. Die polaren Kopfgruppen sind üblicherweise zwei Glycerol- oder ein Glycerol- und ein Nonitol-Rest^[67-69].

3.5.4 Extraktion, Reinigung und Phosphorylierung des GDNT-Lipides aus der Rohmasse des *Sulfolobus solfataricus*^[70-72]

Das in der Arbeit verwendete GDNT wurde am Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik e.V. (abgekürzt *iba*) hergestellt. Nach saurer Hydrolyse, Extraktion in Chloroform und anschließender Reinigung mittels Säulenchromatographie erhielten sie aus der Rohmasse, welche das *iba* von der Firma BHP Billiton aus Südafrika bezog, 90 % GDNT und 10 % Caldarchaeol. Im Folgenden wird die Prozedur genau beschrieben.

3.5.4.1 Isolierung des verwendeten GDNT aus der Rohmasse des *sulfolobus solfataricus*^[62,70-72]

Ungefähr 5 g der Archaea-Trockenmasse werden mit einem Volumen von 150 mL 4 M HCl (Roth) versetzt und über Nacht bei 100 °C unter Rückfluss gekocht. Es folgt eine erste Reinigung: die hydrolysierte Lösung wird dazu durch eine G4-Fritte filtriert, das Filtrat verworfen und der Rückstand bei Raumtemperatur mehrere Tage getrocknet. Der getrocknete Rückstand wird in einen Erlenmeyerkolben überführt und mit 50 mL Chloroform ca. 1 h extrahiert. Diese Lösung wird dann erneut filtriert, das Filtrat wird in einen tarierten Rundkolben überführt und das Lösemittel verdampft, was üblicherweise über einen Rotationsverdampfer erfolgt. Die Extraktion in Chloroform wird dabei so oft (bis zu viermal) wiederholt, bis kein Massengewinn mehr im Rundkolben zu verzeichnen ist. Der Rückstand im Kolben ist ein tiefbraunes, zähfließendes Öl, der sogenannte Rohlipidextrakt.

3.5.4.2 Reinigung des verwendeten GDNT, welches aus der Rohmasse des *Sulfolobus solfataricus* gewonnen wurde^[62,70-72]

Dieser Rohlipidextrakt enthält die Tetraetherlipide und Verunreinigungen. Mittels Säulenchromatographie wird dieser Extrakt gereinigt. Auch die Isolierung der Reaktionsprodukte von potentiellen Nebenprodukten und nicht umgesetzten Ausgangsstoffen erfolgt mittels Säulenchromatographie. Durch die Wahl geeigneter Laufmittelsysteme werden die Lipide unterschiedlich schnell von der Säule eluiert.

Die Trennwirkung der Säulenchromatographie basiert auf den physikalischen Stoffeigenschaften der zu trennenden Komponenten. Somit erfolgt eine differenzierte Verteilung zwischen stationärer Phase (Kieselgel) und mobiler Phase (Laufmittel, alle bezogen von der Firma Roth).

Die verschiedenen Komponenten werden durch Adsorption an der Oberfläche der stationären Phase angelagert und können dabei permanent oder temporär festgehalten werden. Je nach Wahl des Laufmittels, welches polar oder unpolar sein kann, werden die Komponenten unterschiedlich schnell von der Säule eluiert. Unpolare Laufmittelsysteme eluieren die Komponenten mit steigender Polarität, also werden die unpolaren Lipide zuerst eluiert. Für die Säulenchromatographien dieser Arbeit wurde Kieselgel 60 der Firma Fluka mit einer Partikelgröße von 0,063 - 0,2 mm eingesetzt.

Die Reinigung des Rohlipidextraktes erfolgte in drei säulenchromatographischen Schritten. Im ersten und dritten Fall wurde die Säule zuerst mit Kieselgel 60 beschickt, welches in Chloroform aufgeschlämmt wurde. Im zweiten Fall erfolgte dies mit einem 9:1 Chloroform/Methanol-Gemisch.

Der erste Säulenchromatographie-Durchlauf erfolgt mit dem Rohlipidextrakt gelöst in Chloroform, welches zum Auftragen des Rohlipidextraktes auf das Kieselgel dient. Dann folgt das Laufmittelsystem 20 % Diethylether in Chloroform, welches das Caldarchaeol aus der Säule wäscht. Zum Schluss des ersten Schrittes wird dann 20 % Methanol in Chloroform zugegeben, welches das GDNT aus der Säule eluiert. Im zweiten Säulenchromatographie-Durchlauf wird die GDNT-haltige Fraktion der ersten Säule durch ein Laufmittelsystem, bestehend aus 10 % Methanol in Chloroform, weiter aufgetrennt. Im dritten und letzten Säulenchromatographie-Durchlauf wird das fast reine GDNT, gewonnen aus der zweiten Säule, erneut in einem Methanol/Chloroform-

Gemisch gereinigt. Hier wird allerdings der Methanol-Anteil von 10 % auf 2 % reduziert. Nach der dritten Säulenchromatographie liegt reines GDNT vor.

Überprüft wird der Reinigungsfortschritt über Dünnschichtchromatographie und FT-IR Spektroskopie.

3.5.4.3 Darstellung von GDNT-P aus dem gewonnen GDNT

Das wie oben dargestellte und gereinigte GDNT wird in trockenem Dichlormethan gelöst und mit POCl_3 (Sigma) und der Base Diisopropylethylamin (Sigma) in equimolarem Verhältnis zu den Hydroxylgruppen ($n_{\text{POCl}_3} = n_{\text{DIAE}} = 6 \cdot n_{\text{GDNT}}$) umgesetzt. Die Reaktion verläuft über ca. eine Stunde bei 50 °C. Der Reaktionsfortschritt kann über Dünnschichtchromatographie verfolgt werden. Nachdem das GDNT vollständig umgesetzt war, erfolgt die Hydrolyse der Säurechloride durch Zugabe von deionisiertem Wasser. Nun wird das Lösungsmittel über einen Rotationsverdampfer entfernt, das phosphorylierte Lipid in Isopropanol aufgenommen und im Ultraschallbad homogenisiert. Deionisiertes Wasser wird zugesetzt, um eine Konzentration von Isopropanol/Wasser von 3/7 einzustellen. Die Überprüfung der Reaktion über Dünnschichtchromatographie erfolgt nur indirekt über die Abnahme der GDNT-Bande. FT-IR Spektroskopie und MS MALDI-TOF bestätigen die abgelaufene Reaktion und die Reinheit des Produktes.

3.5.5 Anwendungsbeispiele für die Verwendung von Tetraetherlipiden

Der Tetraetherlipid (TEL) findet vielfältige Verwendung: als ungewöhnliches Gleitmittel, in Systemen zur Genfreisetzung, in Monolayerlipidmatrizen (für Sensor-Entwicklungen) und bei der Stabilisierung von Proteinen^[60]. *Antonopoulos et al.*^[58] führten Untersuchungen von Oberflächenbeschichtungen^[61,73] auf verschiedenen Materialien mit TEL auf der Suche nach stabilen, inerten, hoch geordneten, biokompatiblen Anwendungen durch. Ein interessantes Beispiel ist die Erstellung einer planaren Filtrationsmembran aus einer TEL-Schicht^[74] und eine Anlagerung von Polylysin auf dieser Oberfläche, was ein freitragendes, stabilisiertes und porenüberspannendes Polymernetzwerk ergab^[58]. Weiterhin forschte sein Team an sphärischen Affinitätstrennmatrizen, speziellen biokompatiblen Implantatmaterialien ohne thrombogene Eigenschaften und Abwehrreaktionen, Matrizen für funktionalen Proteinabbau im Bereich der Herstellung von Biosensoren, stark belastbaren Gleitfilmen und TEL-haltigen Liposomen wie z. B. magensaftresistenten Arzneistoffvesikeln^[58].

Auch die Herstellung verschiedener Arten von Kompositmaterialien mit Tetraetherlipiden wurde patentiert^[75].

Oberflächenbeschichtungen durch den TEL können auch selbstorganisiert ablaufen^[76]. Hier bildet der TEL bevorzugt eine geschlossene Schicht aus senkrecht parallel zueinander stehenden TEL-Molekülen. Dies ermöglicht eine Beschichtung, die bis 300 °C temperaturbeständig ist und eine hohe chemische-, UV- sowie Säurebeständigkeit hat^[77]. Des Weiteren ist die Schicht unreaktiv, nicht leitend und bei mehreren Schichten sogar als Isolator verwendbar. Weiterhin bietet die Schicht viele Möglichkeiten, über kovalente Bindungen beliebig andere Moleküle anzulagern, und so die fest auf der Oberfläche angebundene Schicht zu modifizieren. In der Medizin können Kanülen oder Schläuche mit einer oder zwei Lagen TEL beschichtet werden, so dass die Oberfläche leichter gereinigt werden kann. Dies ist jedoch derzeit noch ein schwieriger Prozess. Auch eine Anlagerung von Silbernanopartikeln an TEL-Schichten zwecks antibakterieller Wirkung ist möglich. Sie können als in Glas eingebaute optische Sensoren mit einer solchen Beschichtung nahezu wartungsfrei verwendet werden. Das Hauptaugenmerk von TEL-Anwendungen liegt jedoch laut verschiedener Veröffentlichungen eher auf der Antihaft- und Antibakteriziden- und Korrosionsschutzeigenschaft^[76], denn durch die Adaption und Angleichung der natürlichen Vorbilder konnte das TEL helfen, die Kontaktfläche für Staub, Wasser und auch einzellige Lebensformen (Algen, Bakterien) stark zu verringern^[71,78,79]. Nach mehreren Wochen bildeten sich auf TEL-Schichten keine Biofilme, was z.B. Wartungs- und Folgekosten reduziert^[80].

3.6 Dynamische Lichtstreuung und ζ -Potential

3.6.1 Dynamische Lichtstreuung^[33-35,81-84]

Die Dynamische Lichtstreuung (DLS) ermöglicht eine Bestimmung der hydrodynamischen Radien von Partikeln. Die Grundlage für diese Methode wurde schon 1827 vom Engländer Brown unter dem Mikroskop beobachtet. Die als sogenannte Brown'sche Molekularbewegung bezeichnete Beobachtung zeigt eine spontane, ziellose und permanent durchgeführte Wärmebewegung der kleinsten Teilchen in einer Flüssigkeit. Dies lässt sich auch auf die größeren, festen Partikel in einer Dispersion übertragen. Die Verknüpfung der Einstein-Smoluchowski-Beziehung über die Brown'sche Bewegung (1), die Stokes-Einstein-Beziehung (2), sowie der

Reibungskoeffizient f (3) einer Kugel in einem Medium mit einer bestimmten Viskosität ist nötig, um die Berechnung des hydrodynamischen Radius zu erreichen:

$$D = \frac{\Delta^2}{2t} \quad (1); \quad D = \frac{k \cdot T}{f} = \frac{R \cdot T}{N_A \cdot f} \quad (2); \quad f = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \quad (3)$$

Aus den drei Formeln resultiert für den hydrodynamischen Radius r (4):

$$r = \frac{R \cdot T \cdot t}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot N_A \cdot \Delta^2} \quad (4)$$

mit Δ = Sprunglänge; t = Sprungzeit, D = Diffusionskoeffizient, k = Boltzmann-Konstante, T = Temperatur, N_A = Avogadro-Konstante, R = allgemeine Gaskonstante, f = Reibungskoeffizient, η = Viskosität

Aus Gleichung (4) kann nun entnommen werden, dass kleine Partikel schnelle und große Partikel langsame Bewegungen vollführen.

Der Z-Average ist in der Dynamischen Lichtstreuung die wichtigste und stabilste Zahl der Partikelgröße, welche durch die Technik ermittelt wird. Sie ist die Größe, welche genutzt wird, wenn die Qualität verschiedener Messung kontrolliert und verglichen wird. Die Proben sollten aus monodispersen und sphärischen Partikeln bestehen und unter den Selben Bedingungen (Lösungsmittel, Methode, Küvette) hergestellt und gemessen werden. Auch ist wichtig, dass die Messungen nur einen Peak zeigen.

3.6.2 Wechselwirkungen^[33-35,81-84]

Diese Stoßkräfte sind nicht die einzigen Wechselwirkungen, die zwischen den Teilchen wirken. Es gibt generell anziehende und abstoßende Wechselwirkungen. Zu diesen Wechselwirkungen und Kräften zählt neben der van-der-Waals Kraft auch die Coulomb-Kraft. Zusätzlich wirken zwischen den kolloidalen Teilchen noch die zwischenmolekularen und zwischenpartikulären Kräfte, sowie die Wirkung des Dispersionsmittels. Nach der von Deryagin, Landau, Verwey und Overbeek entwickelten DLVO-Theorie ergibt sich für die Partikel eine Gesamtwechselwirkungskraft aus der Summe der sich überlagernden, abstoßenden und anziehenden Wechselwirkungen. In Abbildung 3.15 wird die Veränderung der freien Enthalpie ΔG gegen den Abstand H an vier Beispielen eines spezifischen Potentialverlaufes dargestellt: M_1 stellt ein primäres Minimum und M_2 ein sogenanntes sekundäres

Minimum dar. Liegt M_2 in der Größenordnung von wenigen $k_B T$, so können kleine, relativ schwache Aggregate (Flocken) entstehen, welche aber nur begrenzt stabil sind und durch starkes Rühren zerstört werden können. Die Energiebarriere, von der vorher die Rede war, wird durch das Maximum P dargestellt. Zusätzlich ist die Stabilität von der Oberflächenspannung und der Größe der Grenzfläche abhängig. In Abbildung 3.15 werden die anziehende Wechselwirkung (i), die abstoßende Wechselwirkung (ii) und ihre Summe (iii) dargestellt.

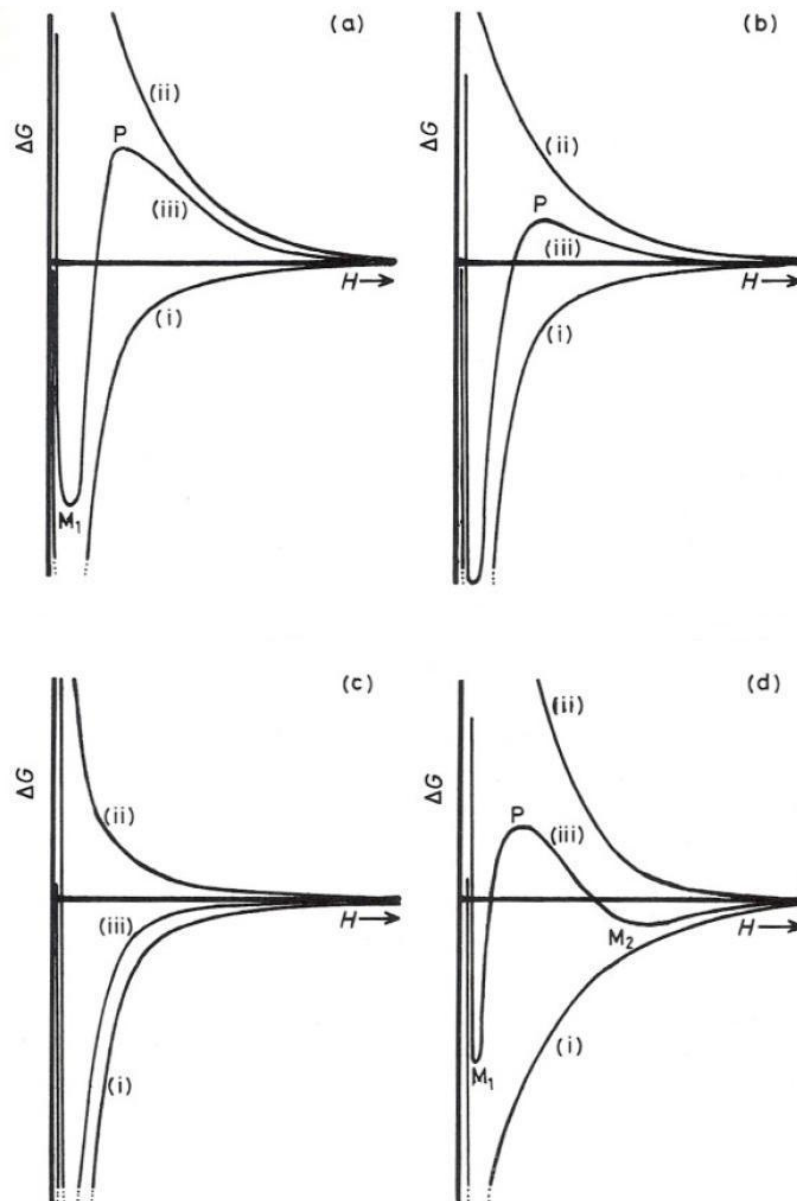


Abbildung 3.15 - Vier verschiedene Fälle (a, b, c & d) der Potentialveränderung zur Erklärung der DLVO-Theorie^[35]

Fall a (Abbildung 3.15 a) stellt eine hohe Energiebarriere infolge stark abstoßender Wechselwirkungen dar. Diese verhindert den Kontakt der Partikel untereinander, denn

sie ist so groß, dass sie nicht überwunden werden kann und damit M_1 unerreichbar wird. Es kommt also zu keinem Kontakt, sondern zu einer Trennung der Teilchen. Dies führt zu einer Stabilisierung der Partikel. Fall b stellt einen ähnlichen Zustand wie a dar, jedoch ist die Energiebarriere (P) erniedrigt, so dass jetzt M_1 erreicht werden kann, wenn das primäre Maximum auf wenige $k_B T$ absinkt. Hier ist die kolloidale Phase nicht stabil und geht unter Agglomeration in die Volumenphase über. Fall c (Abbildung 3.15 c) beschreibt mit einer verstärkten Form von Fall b (Abbildung 3.15 b) den leichtesten Weg: (iii) hat kein Maximum P und daher kann das System, ohne Energiezufuhr, das primäre Minimum erreichen. Fall d (Abbildung 3.15 d) besitzt ein flaches sekundäres Minimum vor dem primären Maximum P. Dies stellt einen teilkoagulierten Zustand dar. In diesem Fall kommt es zu einer Erhöhung der Viskosität des kolloidalen Systems und reversibler Flockenbildung.

3.6.3 Das ζ -Potential^[33-35,81-84]

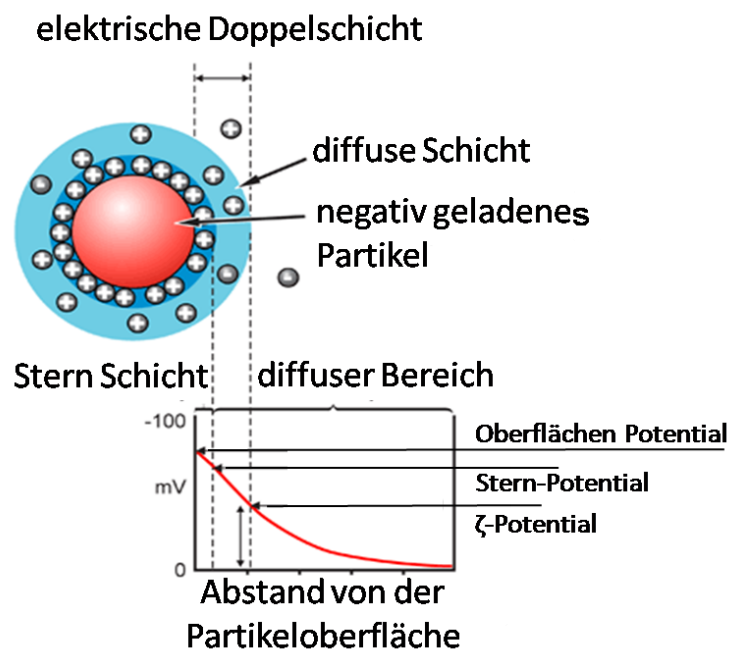


Abbildung 3.16 - Schematische Darstellung der Stern- und der diffusen Schicht sowie des ζ -Potentials

Eine ζ -Potential Messung basiert auf der Messung von Oberflächenpotentialdifferenzen zwischen den Nanopartikeln und dem Lösungsmittel, durch die sie sich bewegen. Um das ζ -Potential zu verstehen, müssen vorab ein paar Begrifflichkeiten erklärt werden. In Abbildung 3.16 wird ein Partikel betrachtet, das eine negative Oberflächenladung hat. Diese führt dazu, dass direkt auf der Oberfläche positive Ladungen bzw.

Partialladungen des Lösungsmittels angelagert werden. Eine sogenannte elektrostatische Doppelschicht kann in die stark geordnete Sternschicht und die nicht mehr so stark geordnete diffuse Schicht unterteilt werden. Die Anlagerung von entgegengesetzt geladenen Partikeln wirkt nach außen wie eine Kompensation der Ladung. Je weiter entfernt sich ein geladenes Teilchen von einem geladenen Partikel aufhält, desto geringer sind deren Einflüsse aufeinander. Äußere Einflüsse, wie z.B. Reibung oder diffusionsgesteuerter Austausch, können einen Teil der locker gebundenen diffusen Schicht abscheren. So erscheint das Partikel nicht mehr elektrisch neutral, sondern besitzt wieder ein Potential. Dies bedeutet, dass es zwischen der diffusen und starren Schicht zu einem Potentialabfall kommt, der innerhalb der starren Schicht linear und innerhalb der diffusen Schicht exponentiell abfällt (Abbildung 3.16). Dieses Potential an der Abschergrenze wird als ζ -Potential bezeichnet und kann nicht direkt gemessen werden. Daher bedient sich die Methode der Messung der elektrophoretischen Mobilität des Partikels (Abbildung 3.17). Ein geladenes Partikel bewegt sich bei einer angelegten Spannung durch die Lösung zur entgegengesetzt geladenen Elektrode hin. Auf diesem Weg lassen sich verschieden stark geladene Partikel unterscheiden, und so ist es möglich, die Geschwindigkeit der Partikel mit der Feldstärke zusammen als deren Mobilität auszudrücken. Bei dieser Methode, genannt *Laser Doppler Velocimetry* (LDV), wird ein Laserstrahl durch eine Küvette gestrahlt, welche die zu untersuchende Dispersion enthält.

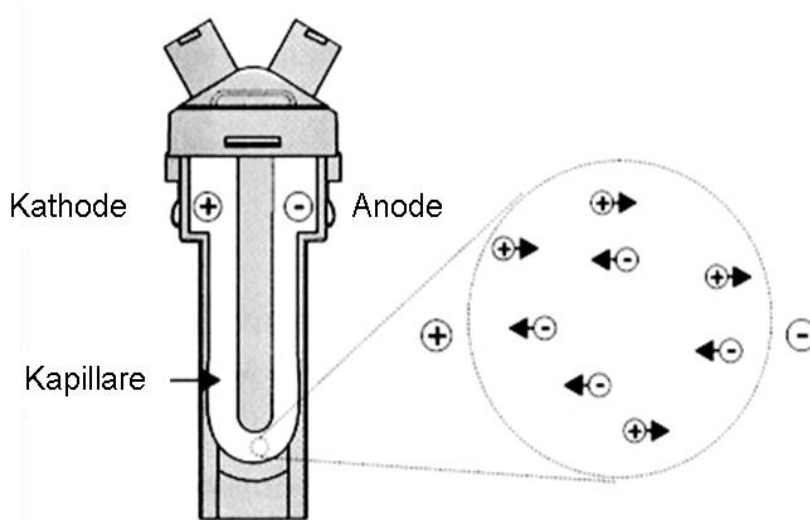


Abbildung 3.17 - Darstellung der Ionenwanderung in einer Lösung bei angelegter Spannung

Das Licht streut in einem bestimmten Winkel (17°) und wird mit einem Referenzstrahl kombiniert. Hieraus ergibt sich eine Fluktuationsrate, die zur Partikelgeschwindigkeit proportional ist.

Das ζ -Potential kann auch mathematisch errechnet werden:

$$U_E = \frac{2 \cdot f(k\alpha) \cdot \varepsilon \cdot \zeta}{3\eta} \quad (5)$$

U_E = elektrophoretische Mobilität, $f_{(k\alpha)}$ = Henry-Funktion; ζ = Zeta-Potential,

ε = Dielektrizitätskonstante der kontinuierlichen Phase (des Lösungsmittels)

Die Henry-Funktion setzt sich aus einem Quotienten zwischen dem Partikelradius (a) und der Ausdehnung bzw. Dicke der elektrostatischen Doppelschicht zusammen. Die Dicke der elektrostatischen Doppelschicht ist abhängig von der Ionenstärke in der Lösung. Ein dreiwertiges Ion (Al^{3+}) drückt die Doppelschicht zu einer größeren Ausdehnung auseinander als ein einwertiges Ion (Na^+)^[85]. Bei Messungen im wässrigen Medium, einer Elektrolytkonzentration unter $10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ und Nanopartikeln mit einer Größe von mehr als 10 nm, kann laut der Smoluchowski-Näherung, der Wert der Funktion gleich 1,5 gesetzt werden. Die wichtigste Aussage des ζ -Potentials ist ein Wert von $|\zeta| = 30 \text{ mV}$. Dieser steht für stabile Partikel, die nicht zur Agglomeration neigen^[86, 87]. Liegen die Messwerte zwischen diesem Bereich, so kann die Stabilisierung nur über sterische Abstoßung und nicht über elektrostatische Abstoßung erfolgen.

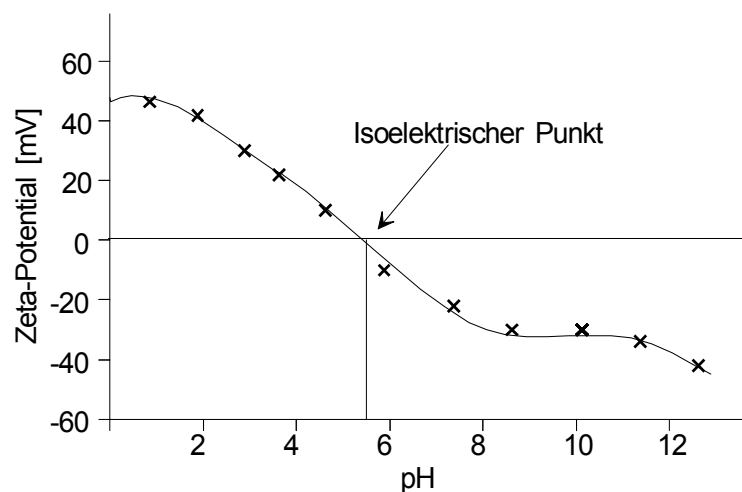


Abbildung 3.18 - Darstellung des Isoelektrischen Punktes^[85]

Durchläuft das ζ -Potential den Nullpunkt, so sind die Partikel ungeladen und liegen im Isoelektrischen Punkt (Abbildung 3.18) vor^[86]. Am Isoelektrischen Punkt ist die Summe der Ladungen aller funktionellen Gruppen eines Proteins gleich null. Dies lässt sich gleichermaßen auf geladene Partikel übertragen. Wird der pH-Wert variiert, so kann ein geladenes Partikel oft in ein ungeladenes Partikel überführt werden. Eine stabile Disper-sion zeichnet sich dadurch aus, dass die in ihr enthaltenen Partikel gleichmäßig verteilt sind, ähnlich wie in einer „echten“ Lösung. Ist die Stabilisierung nicht ausreichend, so kommt es zum Ausfällen der Partikel. Die entstehenden Flocken werden auch als Agglomerate bezeichnet. Durch das Anlegen von Scherkräften wie Ultraschall oder Rühren kann eine eingetretene Flockung für eine gewisse Zeit reversibel aufgehoben werden^[85]. Die Flockung kann so nicht verhindert werden, denn sie ist ein dynamischer Effekt. Die Teilchen werden lediglich mechanisch belastet, wodurch sie sich voneinander lösen. Stoppt man die Scherkräfte, so kann aufgrund der nicht erfolgten Stabilisierung die Agglomeration wieder ablaufen.

3.7 Kernresonanzspektroskopie

Die Kernresonanzspektroskopie^[88-91] hat sich seit vielen Jahren schon als sehr hilfreich zur Bestimmung von chemischen Strukturen erwiesen. Ihr ursprünglicher Name kommt aus dem Englischen (*nuclear magnetic resonance*). Die daraus resultierende Abkürzung NMR ist international gültig. Zur Auflösung der chemischen Struktur eines Stoffes wird die zu untersuchende Substanz einem homogenen, statischen Magnetfeld B_0 ausgesetzt, und über Kerndrehimpuls-Quantenzahl I und magnetische Quantenzahl m lassen sich Energieniveaus der Protonen im Magnetfeld bestimmen. Es ergeben sich strukturabhängige Signale, die durch eine spezifische chemische Verschiebung (in ppm) und durch ein optisches Erscheinungsbild ausgezeichnet sind. In der gesamten NMR-Spektroskopie gibt es sehr viele Einflüsse von Kernen, chemischen Eigenschaften der funktionellen Gruppen, Ladungsverteilungen und Positionen von Substituenten, die das Spektrum charakteristisch beeinflussen. Dies wird unter anderem durch die chemische Verschiebung ausgedrückt. Sie ist von der Elektronegativität und der Ladungsdichteverteilung der umgebenden Atome abhängig. Im Spektrum folgt daraus eine stärkere oder schwächere Ent- oder Abschirmung eines Kernels im elektrischen Feld, was eine Erhöhung oder Erniedrigung des ppm-Wertes im Spektrum nach sich zieht. Das Spektrum kann sich durch das Ausbilden von Multipletts verändern, was sich

durch mehrere mögliche Kombinationen für die magnetische Quantenzahlen m_l eines Protons erklären lässt. Dies bedeutet, dass nicht alle Protonen ein einzelnes Signal ergeben, sondern sich in mehrere Signale, mit unterschiedlicher Intensität, aufteilen lassen. Hierbei können die Intensitätsverhältnisse über das Pascal'sche Zahlendreieck bestimmt werden. Ein Singulett hat dann die Intensität 1 ($n=0$). Bei einem Dublett sind beide Signale ebenfalls mit der Intensität 1 vertreten. Ein Triplet hat die Intensitätsverteilung 1:2:1, ein Quartett 1:3:3:1 und so weiter. Dies ist nicht nur ein Vorteil, denn wenn die Protonensignale sehr dicht beieinander liegen und starke Multipletts ausbilden, können so leicht Überlagerungen auftreten, die eine Zuordnung sehr erschweren.

Die NMR-Spektroskopie besitzt aber noch viele andere wichtige Eigenschaften, die hier nicht weiter erläutert werden sollen. An dieser Stelle sollen daher die Standard-Spektren der ^1H -Resonanz und ^{13}C -Resonanz nicht weiter erläutert werden. Es wurden neben diesen Methoden auch noch *distortionless enhancement by polarization transfer*-Spektren (kurz DEPT) und 2D- ^1H - ^{13}C -Spektren aufgenommen. Bei einem DEPT-135-Spektrum wird, wie der Name vermuten lässt, über einen Polarisationstransfer das Erscheinungsbild eines ^{13}C -Spektrums verändert. In dieser Arbeit wurde von den möglichen Pulswinkeln 45° , 90° und 135° nur der letztere gewählt. Hier werden die Kohlenstoffatome abhängig von der Zahl der an sie gebundenen Protonen verschieden dargestellt. In einem normalen ^{13}C -Spektrum haben alle Signale eine positive Intensität. Dies gilt bei einem DEPT-135-Spektrum nur für die CH und CH_3 -Gruppen eines Moleküls. Die Intensität der CH-Signale wird hier gegenüber einem ^{13}C -Spektrum verstärkt. Die CH_2 -Gruppen besitzen eine negative Intensität, und die wasserstofffreien, quartären Kohlenstoffe sind nicht zu sehen. Somit lassen sich zusätzliche Informationen gewinnen.

2D- ^1H - ^{13}C -Spektren gehören zur Gattung der heteronuklearen zweidimensionalen Spektren. Hier werden die Kopplungen der beiden untersuchten heterogenen Kerne über **eine** Bindung dargestellt. In einer zweidimensionalen Darstellung kann so z.B. das ^{13}C - oder DEPT-135-Spektrum gegen das ^1H -Spektrum aufgetragen werden. Die Signale werden jetzt als Flächen dargestellt, deren Intensität verschiedene Farben zeigt, ähnlich der Darstellung eines Berges in einer topographischen Karte. So wird im idealen Fall ein bestimmtes Protonensignal einem Kohlenstoffatom zugeordnet^[88-91].

Die NMR-Spektren dieser Arbeit wurden an drei verschiedenen NMR-Geräten aufgenommen: Das DPX 300 MHz NMR-Gerät (Bruker) diente zum Erstellen erster Testspektren. Die im Arbeitskreis von Prof. Dr. P. Bayer vorhandenen NMR-Spektrometer wurden für die hochaufgelösten NMR-Spektren genutzt. Es handelt sich um das 400 MHz FT-NMR-Spektrometer „Microbay“, sowie das Avance II 700 MHz NMR-Spektrometer, beide von der Firma Bruker. Die 300 MHz- und 400 MHz NMR-Spektrometer konnten ^{31}P -Messungen durchführen, das 700 MHz NMR-Spektrometer jedoch nicht.

3.8 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) ist ebenfalls eine weit verbreitete Methode, um eine Strukturaufklärung zu erreichen. Hier wird eine Probe der zu untersuchenden Substanz erst verdampft und ionisiert. Ist dies geschehen, werden die Ionen durch das Anlegen einer Spannung beschleunigt, durch ein Magnetfeld geschickt, und nach ihrer Masse aufgetrennt. Unter diesen Bedingungen entstehen aus einer Struktur sehr häufig charakteristische Bruchstücke, die sich zuordnen und identifizieren lassen. Ein Massenspektrometer wird oft mit anderen Messgeräten wie z.B. einem Gaschromatographen kombiniert, was zusätzliche Vorteile bringt. Sehr große Moleküle, wie das Tetraetherlipid, sind schwierig zu identifizieren, denn die Anzahl möglicher Bruchstücke ist hier sehr hoch und nicht auswertbar. Interessant ist daher bei der Untersuchung des Lipids der Molekülpeak. Die MS ist nicht quantitativ, daher lassen sich die Intensitäten der Signalpeaks zwar vergleichen, geben aber keine Auskunft über die prozentuale Verteilung der Intensität im Vergleich untereinander^[89-91]. Die in der Arbeit verwendete Methode war die ESI-Methode. Das verwendete Gerät war das BioTOF III der Firma Bruker.

3.9 Rasterelektronenmikroskopie und energiedispersive Röntgenspektroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie^[81-83, 89, 92] dient der Untersuchung der Topographie und Morphologie von Oberflächen. Die Auflösung liegt hierbei üblicherweise im niedrigen μm - bis nm -Bereich. Bei rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen

werden in einem Rasterelektronenmikroskop (REM) Elektronen thermisch emittiert, über elektromagnetische Linsen gebündelt und durch eine Spannung im 5-30 kV-Bereich beschleunigt. Dieser gebündelte Elektronenstrahl rastert die Oberfläche ab und erzeugt bei den Atomen der Probe sogenannte Sekundär-Elektronen (auch Rückstreuелеktronen genannt). Sie werden über einen Detektor in elektrische Signale umgewandelt und zur Berechnung eines digitalen Bildes verwendet. Die Technik setzt voraus, dass die Probe elektrisch leitend ist. Nichtleitende Proben müssen daher z.B. mit Gold oder Palladium besputtert werden. Die Auflösung eines REMs ist abhängig von der Spannung, die zur Beschleunigung eingesetzt wird, der Wellenlänge der Elektronen und von der Beschaffenheit der Probe. Die in der Arbeit gezeigten REM-Bilder wurden mit einem Quanta FEG 400 der Firma FEI angefertigt. Dieses REM hat eine maximale Auflösung von 2 nm. Die zur Untersuchung der hergestellten Nanopartikel genutzten Spannungen lagen bei 20 oder 25 kV, je nach Probenbeschaffenheit. Bei 30 kV wurden manche Partikel zu schnell zerstört, um ein gut aufgelöstes Bild aufzunehmen.

Vor dem Erstellen der REM-Aufnahmen wurden die Proben wie folgt präpariert: Auf einem Probenhalter wurde ein Kohlenstoff-Klebeband befestigt, welches von beiden Seiten kleben kann. Auf der noch freien Seite wurde ein ca. 1x1 cm großes Siliciumwaferstück mit der matten Seite aufgeklebt, so dass die Probe auf die glänzende Seite aufgetragen werden konnte. Von den Proben wurde ein Volumen von ~ 100 µL aufgetragen und bei RT getrocknet. Um im REM eine gute Auflösung erreichen zu können, wurden die Proben anschließend mit einer Gold-Palladium-Schicht bedampft. Dies erfolgte bei einer Stromstärke von 15 mA für 30 s, was einer Schichtdicke von ca. 2 nm entspricht. Hierzu wurde die Sputteranlage K 550 der Firma Emitech verwendet.

An das verwendete REM-Gerät war ein EDAX EDS-Analysensystem des Typs „Genesis 4000“ angeschlossen. Die energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX) ermöglicht eine Untersuchung der elementaren Probenzusammensetzung. Dabei wird über Elektronenbeschuss emittierte Röntgenstrahlung detektiert, die für jedes Element der Probe charakteristisch ist. Bei einer Analyse der emittierten Röntgenstrahlung in Abhängigkeit der Energie ist es möglich, die enthaltenen Elemente zu identifizieren. Diese Methode ist semiquantitativ, denn jedes Element hat eine bestimmte Spannung, bei der es optimal angeregt wird. Diese Energiebereiche sind aber unterschiedlich, so dass manche Elemente auch außerhalb des Anregungsoptimums liegen, daher lassen sich nur die Anwesenheit angeregten Elemente quantifizieren. Eine exakte prozentuale

Zuordnung der Elemente ist nicht möglich. Die Genauigkeit der Methode liegt bei ca. 1 %.

3.10 Transmissionselektronenmikroskopie

Das Prinzip der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ist ähnlich dem der Rasterelektronenmikroskopie. Es werden ebenfalls Elektronen thermisch emittiert und über eine angelegte Spannung beschleunigt. Die Spannungen bei der Transmissionselektronenmikroskopie liegen aber deutlich höher: 50-300 kV. Das Linsensystem besteht aus stromdurchflossenen Spulen, die ein elektromagnetisches Feld erzeugen und den Elektronenstrahl fokussieren. Dies ist wieder sehr ähnlich zum REM, aber der fokussierte Strahl trifft auf die Probe und durchstrahlt diese, wobei er teilweise abgelenkt wird. Hierbei bestimmt die Elektronendichte in der Probe den Grad der Ablenkung. Die gestreuten Elektronen werden über ein Objektiv gesammelt und ein Zwischenbild entsteht, welches weiter vergrößert auf einen Leuchtschirm projiziert wird^[89]. Die TEM-Bilder wurden im Rahmen einer DAAD-Kooperation mit der *Università Bologna* in der Arbeitsgruppe von Prof. A. Bigi durchgeführt. Verwendet wurde ein *Philips CD100 transmission electron microscope*.

3.11 Thermogravimetrie

Die Thermogravimetrie (TG) ist eine thermoanalytische Methode, bei der eine Probe in einer definierten Atmosphäre einer meist mit der Zeit linearen Temperaturerhöhung ausgesetzt wird. Üblicherweise werden die Atmosphären in drei verschiedene Arten unterteilt: inert (Verwendung von N₂ oder Ar), oxidierend (Verwendung von O₂) oder reduzierend (Verwendung von H₂ oder Luft). Unter diesen Bedingungen wird das Gewicht der Probe, die sich in einem offenen Tiegel befindet, gemessen. Durch die Temperaturerhöhung tritt oft eine thermische Zersetzung der Probe ein, was einen Masseverlust zur Folge hat. Dieser wird in Form eines Thermogramms dargestellt. Hieraus wird ersichtlich, bei welcher Temperatur und wie viel Masseverlust erfolgt. Bei der Kopplung an ein Infrarot (IR)-Spektrometer können die entstandenen Zersetzungsprodukte sofort spektroskopisch analysiert werden. Über den Verlauf der Zersetzungskurve und die Informationen des IR-Spektrums lässt sich die Zusammensetzung der Probe oder des Gases bei einer bestimmten Temperatur ermitteln^[89]. Die in dieser Arbeit gezeigten Thermogramme wurden an dem Gerät *Luxx STA 409 PC/PG* der Firma *Netzsch* aufgenommen. Als Probenträger wurde ein nicht

verschlossener Al_2O_3 -Tiegel verwendet, der mit einer Masse von 21,5 mg beladen wurde. Alle Messungen wurden unter einer dynamischen N_2 -Atmosphäre (50 mL min^{-1}) bei einer Heizrate von 2 K min^{-1} durchgeführt.

3.12 Atomabsorptionsspektroskopie und Elementaranalyse

Bei der quantitativen Methode der Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) wird die zu untersuchende Probe in einer Flamme oder in einem Graphitofen atomisiert. Durch Energie in Form von Licht verschiedener Wellenzahlen und bestimmter Intensität werden die Elektronen der Atome promoviert und gehen in einen angeregten, aber nicht stabilen Zustand über. Kehren die Elektronen in den Grundzustand zurück, so emittieren diese die Energie in Form von Licht einer bestimmten Wellenlänge und Intensität. So lassen sich über einen Detektor die Energiedifferenzen zwischen ein- und ausgetretenem Licht messen. Diese Differenz ist proportional zur Konzentration des zu untersuchenden Elementes. Über das Lambert-Beer'sche Gesetz kann die Konzentration berechnet werden (6 und 7):

$$E = -\lg \frac{I}{I_0} \quad (6)^{[93]}$$

$$E = \varepsilon_\lambda \cdot c(x) \cdot d \quad (7)^{[93]}$$

E = Extinktion der Probe; ε = Extinktionskoeffizient; d = Schichtdicke;
 $c(x)$ = Konzentration der Substanz (x)

Die in dieser Arbeit bestimmten Calcium-Messungen wurden mit einem Atomabsorptionsspektrometer der M-Serie der Firma *Thermo Electron Corporation* durchgeführt.

Für die Untersuchung der organischen Komponenten der Nanopartikel ist die AAS-Methode nicht hilfreich, daher wurde hier die CHNS-Analyse verwendet. Diese Verbrennungsanalyse setzt eine Probe in einem Oxidationsreaktor reinem Sauerstoff bei hohen Temperaturen ($800\text{-}900^\circ\text{C}$) aus, was eine Verbrennung der Probe zur Folge hat. Kohlenstoff wird dabei zu CO oder CO_2 oxidiert, Wasserstoff reagiert zu Wasser, Stickstoff zu Stickoxiden oder molekularem Stickstoff und Schwefel zu SO_2 . Die entstandenen Verbrennungsprodukte werden nun gaschromatographisch aufgetrennt. Zu diesem Zweck wird das Verbrennungsgas zuerst von einem Trägergas über einen

heißen Kupferoxidkontakt transportiert, wodurch die Stickoxide vollständig zu N₂ reduziert werden. Nun folgt die Auftrennung in einem Gaschromatographen und die Weiterleitung zu einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor, was eine quantitative Bestimmung ermöglicht. Die in dieser Arbeit bestimmten Kohlenstoff-, Stickstoff-, Wasserstoff- und Schwefelgehalte wurden mittels CHNS-Analysen mit einem Analysator EA 1110 der Firma CE Instruments durchgeführt.

3.13 Infrarotspektroskopie (IR)

Die Infrarotspektroskopie gehört zu den gängigen Untersuchungsmethoden der Chemie. Die Methode basiert auf der Absorption von Strahlung im infraroten Bereich, was die Molekülschwingungen und -rotationen charakteristisch beeinflusst. Messungen können in allen Aggregatzuständen durchgeführt werden. Die üblicherweise unterschiedenen Schwingungstypen sind die Valenzschwingungen, bei denen das Molekül die Bindungslängen ändert. Deformationsschwingungen können eben („*in plane*“) und uneben („*out of plane*“) auftreten. Hierbei kommt es zu einer Änderung des Bindungswinkels, aber die Bindungslängen bleiben konstant. Die ebenen Schwingungen werden in Spreiz- und Pendelschwingungen unterteilt. Bei den ersteren (auch „*bending*“-Schwingung) neigen sich die Atome gegeneinander, bei dem letzteren Schwingungstyp (auch „*rocking*“-Schwingung) neigen die Atome sich in dieselbe Richtung. Die nicht ebenen Typen unterteilen sich in Torsionsschwingung (auch „*twist*“-Schwingung), bei der das eine Atom nach „oben“ schwingt und das Andere nach „unten“. Ist es der Kippschwingungstyp (auch „*wagging*“-Schwingung), klappen beide Atome in dieselbe Richtung. Über diese Schwingungstypen lassen sich die verschiedenen funktionellen Gruppen zuordnen. Die Grenze der IR-Spektroskopie liegt bei funktionellen Gruppenkombinationen, die im sehr ähnlichen Wellenbereich liegen und sich so überlagern können^[90,91,93]. Die IR-Spektren wurden mit einem *Bruker Vertex 70* Spektrometer aufgenommen.

3.14 Reinigungsmethoden

3.14.1 Dialyse^[39,94,95]

Die Dialyse nutzt einen Konzentrationsgradienten zur Reinigung einer Probe aus. Dieser Gradient sollte möglichst hoch ausfallen. Die in der Arbeit verwendeten Dialyseschläuche sollten dies ermöglichen und wurden hierzu mit der Probe befüllt und in ein Gefäß gegeben, welches das 100-200 fache Volumen der Probe enthält. Die Umgebung hat im idealen Fall eine Konzentration der Verunreinigung von nahezu null, also ist der Konzentrationsgradient maximal. Die Dialyseschläuche können verschiedene Durchlässigkeiten besitzen, je nachdem welches Produkt verwendet wurde. Dieser „*molecular weight cut off*“ muss einerseits alle Verunreinigungen durchlassen (Proteine, Antikörper, Ionen usw.), darf aber andererseits nicht das Produkt durchlassen. Auch das Material des Dialyseschlauches ist wichtig, denn das Umgebungsmedium und die Probe sollen auf keinen Fall mit dem Schlauch reagieren. Laut Hersteller zeigen die aus regenerierter Zellulose bestehenden Dialyseschläuche gute Widerstandsfähigkeit gegen Alkohole, Ketone, Ester und sogar 30 % Wasserstoffperoxid. Starke Säuren können die Schläuche beschädigen. Die Proteinadsorption auf der Oberfläche soll geringer als 1 ng / g Schlauch sein, daher wurden diese Schläuche in der Arbeit verwendet. Sie waren die *Visking Dialysis Tubing* der Firma *Serva Electrophoresis GmbH* und haben einen *molecular weight cut off* (MWCO) von 12 bis 14 kDa, was einer Porengröße von 2 bis 3 nm entspricht.

Die verwendeten Dialyseschläuche wurden trocken und als 2 m oder 5 m langes Stück geliefert und mussten vor der Benutzung erst aufgearbeitet werden. Dies geschah in Reinstwasser, welches mit zwei Massenprozent Natriumhydrogencarbonat und 1 mM EDTA-Lösung versetzt wurde. In dieses Gemisch wurden die zurechtgeschnittenen Schlauchstücke gegeben und zwei bis drei Stunden bei 60 °C gerührt und am Ende 10 min gekocht. Die Prozedur war nötig, da der Hersteller nicht ausschließen kann, dass durch die Herstellung der Schläuche Schwermetalle und schwefelhaltige Verbindungen angehaftet sind, welche Störungen oder Verfälschungen bei der Verwendung verursachen können. Das in den Schlauch eingebrachte Probenvolumen von 5 mL benötigte bei einem Schlauchdurchmesser von 16 mm eine Dialyseschlauchlänge von 10 cm. Für die Anwendung jedoch stellten sich 2 cm längere Schläuche als günstiger heraus, denn die Enden des Schlauches sind offen und müssen mit Klammern verschlossen werden. Dies ist mit ca. 1 cm zusätzlicher

Schlauchlänge pro Seite gut handhabbar, also waren die Dialyseschläuche immer 12 cm lang. Das Rühren der Proben sollte möglichst so erfolgen, dass sich der Schlauch in der Schwebe zwischen Boden und der umgebenden Flüssigkeitsoberfläche befindet. Abbildung 3.19 zeigt den Aufbau. Es ist wichtig, dass sich die Schläuche in der Schwebe befinden, denn der Schlauch darf auf der einen Seite nicht angesogen werden, so dass der Rührfisch gegen den Schlauch oder die Klammern schlägt. Auf der anderen Seite darf der Schlauch nicht an der Oberfläche treiben, da dann keine Diffusion möglich ist und der Schlauch trocknet und dann rissig wird. Das Schweben der Schläuche konnte erreicht werden, wenn in dem Schlauch eine kleine Luftblase eingeschlossen wurde, denn die Klammern waren so schwer, dass der luftfreie Schlauch mit der Probe nicht schwamm, sondern unterging.

In der praktischen Anwendung wurden die ersten Test-Dialysereihen auf Einzelrührplatten durchgeführt (Abbildung 3.19). Hier wurden identische Bechergläser, Rührfische und Uhrgläser zur Abdeckung benutzt. Später zur Reproduktion der Dialyse-Prozeduren wurde eine Mehrfachrührplatte benutzt, wie sie auch bei der Herstellung der Nanopartikel genutzt wurde, damit alle Proben auch die gleiche Rührgeschwindigkeit erfahren.



Abbildung 3.19 - Darstellung der Dialyse-Methode, welche zuerst auf mehreren Einzelrührplatten durchgeführt wurde, später auf der Mehrfachrührplatte

Die genauen Bedingungen der einzelnen Dialyse, wie Dauer, Volumen des eingesetzten Reinigungsmediums und Wechsel des Reinigungsmediums werden in Kapitel 4 erläutert.

3.14.2 Ultrazentrifuge

Die bei der Ultrazentrifugation verwendete Zentrifuge wurde von der Firma *Thermo Electron Corporation* hergestellt. Es handelt sich um ein Gerät aus der *Sorvall WX Ultra* Serie. Diese Ultrazentrifuge kann bis zu 65.000 Umdrehungen pro Minute erreichen und zieht im Probenraum ein Vakuum, so dass die Proben bei konstanter Temperatur zentrifugiert werden. Für die Ultrazentrifugation von wässrigen Proben wurden Röhrchen aus Polyethylen und für ethanol- und isopropanolhaltige Proben wurden Polypropylen-Röhrchen verwendet.

Die Zentrifugation stellt eine einfache Reinigungsmethode für die Trennung eines Feststoffes und einer Lösung dar. Bei Nanopartikeln sind jedoch die auftretenden Kräfte der Zentrifugation problematisch, da sich Nanopartikel mit einer Größe von 50 nm viel schwerer abtrennen lassen. Daher ist eine Ultrazentrifuge notwendig. Ihr Rotor hält einem Vielfachen der Kraft stand, die eine übliche Tischzentrifuge erzeugen kann. Hierbei besteht dann aufgrund der hohen Kräfte die Gefahr, dass die Nanopartikel nicht mehr redispergierbar sind. Die Stabilität zwischen Kern und Stabilisierungssubstanz kann sich durch die auftretenden Kräfte so verändern, dass ein Agglomeratbodensatz geformt wird, der sich durch ein Ultraschallbad oder einen Ultraschallfinger nicht mehr in die einzelnen Nanopartikel zurück überführen lässt.

Die Proben wurden in der Ultrazentrifuge mit Drehzahlen zwischen 15.000 und 40.000 U min^{-1} (23.200 g bis 165.000 g) und Zentrifugierzeiten (30 bis 60 min) verschiedenen mechanischen Belastungen ausgesetzt. Die Proben wurden bei unterschiedlichen Bedingungen zentrifugiert, die individuellen Werte werden in Kapitel 4 an den entsprechenden Stellen angegeben.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel in wässrigem Medium über Polyaminosäuren

In meiner Diplomarbeit^[83] wurde damit begonnen, Calciumphosphate mit Polyaminosäuren (PAS) zu stabilisieren. Hier wurden die Konzentrationen der Calcium- und Phosphatlösungen sowie die eingestellten pH-Werte zwischen 5 und 10 variiert. Des Weiteren wurden die Konzentrationen an PAS zwischen 1 g mL^{-1} bis 5 g mL^{-1} variiert. Dies führte allerdings nicht zu stabilen monodispersen Nanopartikeln, da die Dispersionen nach der Darstellung filtriert werden mussten, um gebildete Agglomerate zu entfernen. Dies wäre ein gravierender Nachteil für die Methode, denn an diesem Punkt würde der Großteil eines zur Stabilisierung und Funktionalisierung verwendeten Proteins verworfen werden und wäre damit umsonst eingesetzt. Des Weiteren wurden kleine Volumina (5 bis 10 mL) an Wasser vorgelegt und die Calcium-, Phosphat- und PAS-Lösungen zugegeben. Der erste Schritt hier war, das vorgelegte Wasservolumen zu erhöhen. So wurden die Calciumphosphat-Nanopartikel so weit verdünnt, dass es zu einer erfolgreichen Stabilisierung mit Polyaminosäuren kam. Hierzu wurde eine Versuchsreihe angesetzt. Im Folgenden wird erst die Polyasparaginsäure-Reihe besprochen und anschließend die Polylysine-Reihe. Auf die Verwendung von Polyglutaminsäure wurde verzichtet, da sie genau wie die Polyasparaginsäure ein negativ geladener Polyelektrolyt mit ähnlicher Struktur und daher auch ähnlicher Stabilisierungsfähigkeit ist.

4.1.1 Die Standard-Fällungsmethode^[83,96,97]

Diese Methode ist die Standardmethode der folgenden Versuchsreihen. Sie wurde immer verwendet, sofern es nicht anders beschrieben wird. Daher wird im weiteren Verlauf der Arbeit auf dieses Kapitel verwiesen. Die eingesetzte Calciumlösung wurde immer aus Calciumlactat-Pentahydrat hergestellt. Die Konzentration der wässrigen Lösung betrug 18 mmol L^{-1} . Zur Phosphatzugabe diente eine $10,8 \text{ mmol L}^{-1}$ wässrige Lösung von Diammoniumhydrogenphosphat. Beide Lösungen werden im Weiteren kurz als Calcium- und Phosphatlösung bezeichnet. Eingestellt wurden die pH-Werte immer mit NaOH ($\sim 1 \text{ mol L}^{-1}$) und HCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Das Einstellen des pH-Wertes der Diammoniumhydrogenphosphatlösung war aufgrund der natürlichen Pufferwirkung des Phosphates sehr genau. Dies stellte sich bei der Calciumlactatlösung als wesentlich

4.1 Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel in wässrigem Medium über Polyaminosäuren

schwieriger heraus; hier wurde die HCl wesentlich öfter benötigt als bei der anderen Lösung. Die zugesetzten Stabilisierungssubstanzen (Polyaminosäuren und Tetraetherlipide) hatten eine Konzentration von 1 g L^{-1} . Ist dies nicht der Fall, so wird ebenfalls darauf hingewiesen. Die Stabilisierungssubstanz wurde im Dispersionsmittel vorgelegt. Ist die Rede von 30 mL Wasser vorgelegt und 0,25 mL PAS-Lösung, so wurden 30 mL Wasser und die 0,25 mL PAS-Lösung vorgelegt, und nicht 0,25 mL PAS-Lösung auf 30 mL Volumen aufgefüllt.

Bei der Standard-Fällungsmethode werden, wie in Abbildung 4.1 dargestellt die Calcium- und Phosphatlösung über eine Peristaltikpumpe gleichmäßig in das vorgelegte Dispersionsmittel gepumpt, welches bereits die Stabilisierungssubstanz enthält. Nach der Zugabe wird **immer** 30 min lang gerührt.

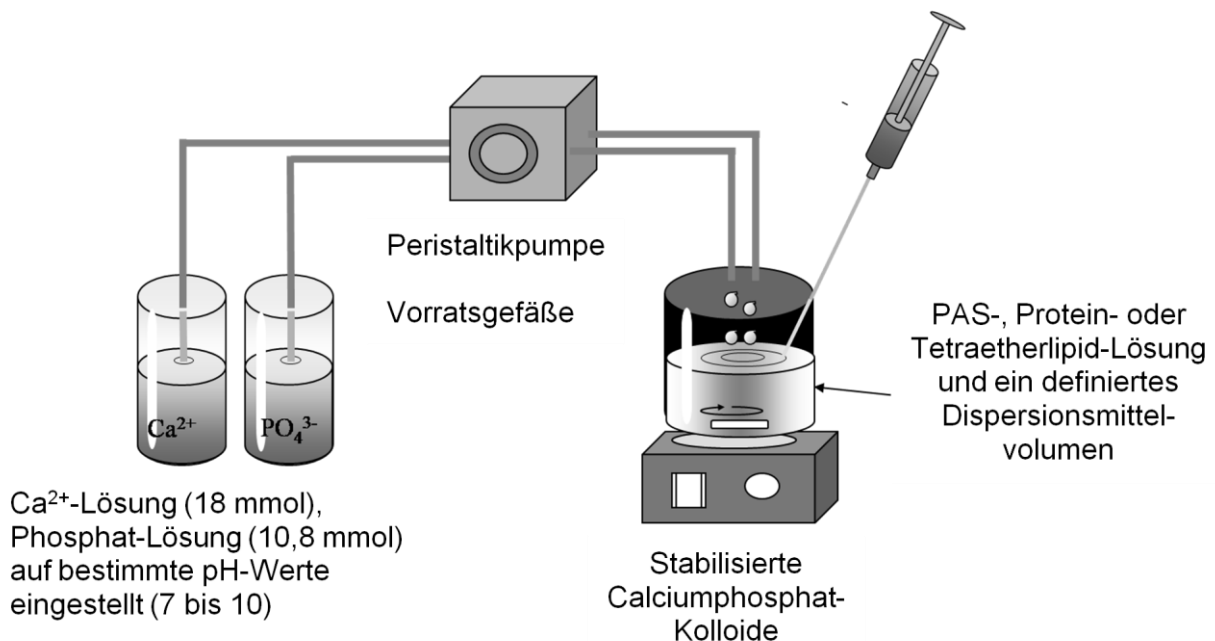


Abbildung 4.1 - Schematische Darstellung der Standard-Fällungsapparatur^[83,96,97]

Die Peristaltikpumpe befördert gleichmäßig definierte Volumina in definierter Zeit. Die Geschwindigkeit der Peristaltikpumpe kann linear verändert werden. Es wurde eine Peristaltikpumpe *Reglo Analog MS/CA2-6* mit zwei Kanälen der Firma Ismatec verwendet. Ein Geschwindigkeitstest ergab für die Geschwindigkeit 10 ein befördertes Volumen von 0,5 mL Lösung in 10 s durch einen Schlauch (3 mL min^{-1}). Die verwendeten Schläuche sind vom Typ Tygon R3607. Ihr Innendurchmesser beträgt 0,95 mm. Die Volumenmenge wurde durch Variation der Zutropfzeit reguliert. Die Geschwindigkeit 10 wurde standardmäßig genutzt, sofern nicht anders beschrieben, da

eine langsame Zugabe dem Stabilisierungsmaterial mehr Zeit verschafft, sich an die entstehenden Calciumphosphat-Nanopartikel anzulagern. Ist dies nicht der Fall, wird dies jedoch erwähnt. Die Zugabe der Calcium- und Phosphatlösungen darf nicht zu schnell erfolgen, denn bei zu schneller Zugabe kommt es schneller zu einer Agglomeration bzw. zum Auskristallisieren des Calciumphosphates bzw. zum Bilden der ersten Kristallisationskeime.

4.1.2 Polyasparaginsäure-Reihe

Die Polyasparaginsäure-Reihe wurde mit einer Verdünnungsreihe begonnen. Hierbei wurden zu Beginn verschiedene Volumina an Wasser vorgelegt (20 und 30 mL). Weiterhin wurden zwei verschiedene Kettenlängen der Polyaminosäure ausgewählt: eine 5-15 und eine 15-30 kDa-Fraktion. Beide wurden wie unter Kapitel 4.1.1. beschrieben mit 1 g L^{-1} angesetzt. Die Proben mit 20 mL Wasservorlage ergaben nach der Zugabe der Aminosäure als Natriumsalz mit der 5-15 kDa Kette einen pH-Wert von $7,1 \pm 0,1$. Die pH-Werte der Proben mit 30 mL Wasservorlage ergaben nach der Zugabe der Aminosäure einen Wert von $6,9 \pm 0,05$. Die zugegebene Menge an Calcium- und Phosphatlösungen (pH 8) betrugen je 1, 2, 3, 4 und 5 mL. Die pH-Werte der Proben waren sehr ähnlich, daher werden sie hier zusammengefasst: Die PAsp-Reihe mit 20 mL Wasservorlage ergaben nach der Zugabe der Calcium- und Phosphatlösungen und dem 30 min Rühren einen pH-Wert von $7,5 \pm 0,05$. Bei der 30 mL Wasservorlage lag der pH-Wert bei $7,7 \pm 0,05$.

Das Einstellen der Lösung auf pH 8 stellte sich als optimal heraus, da die Entstehungsgeschwindigkeit des Calciumphosphates im optimalen Bereich lag. Andere pH-Werte zeigten bei den obigen Bedingungen, dass bei auf pH 7 eingestellten Calcium- und Phosphatlösungen eine Calciumphosphat Bildung ausblieb. Bei den höheren pH-Werten (pH 9 und 10) hingegen verlief die Fällung sehr schnell, da die Löslichkeit des Calciumphosphates bei dem höheren pH-Wert sehr gering ist. Die Peristaltikpumpe transportierte die Calcium- und Phosphatlösungen mit der Geschwindigkeit 6 mL min^{-1} in die Probenlösung. Somit wurden in 10 s 1 mL und in 50 s 5 mL Calcium- und Phosphatlösungen zugepumpt. Die Peristaltikpumpe kann zwei Schläuche gleichzeitig betreiben, somit wurde das Volumen der Calcium- und Phosphatlösung gleichzeitig zugepumpt (z.B. je 1 mL).

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel in wässrigem Medium über Polyaminosäuren

4.1.2.1 Polyasparaginsäure-Reihe mit 20 mL Wasservolumenvorlage

Tabelle 4 fasst die Messungen der 20 mL Wasservorlage-Reihe der PAsp zusammen. Ersichtlich wird, dass die Zugabe einer geringen Menge an Calcium- und Phosphatlösungen zu keinen stabilen Kolloiden führt. Gleiches gilt auch für die zugegebenen Mengen 3, 4, 5 mL an Calcium- und Phosphatlösungen, aber hier konnte im Gegensatz zu den 1 und 2 mL Proben nach 1 min Behandlung in einem Ultraschallbad eine Kurzzeit-Stabilität beobachtet werden.

Tabelle 4 - PAsp-Reihe mit 20 mL Wasservorlage (pH 8)

Polyasparaginsäure-Reihe mit 20 mL Wasservorlage und 1 mL PAsp-Lösung							
M (PAsp)	Ca/P- Volumen	Z-Average (nm)	PDI	Zeitraum der durch- geführten Messungen	ζ-Potential	Korrekturfaktoren ^[85]	Ultraschall- behandlung
kDa	mL	Mittelwert	Mittel- wert		mV	PDI, <i>Cumulants Fit</i> , <i>Correlogram</i> etc.	min
15-30	1	<1000	1,000	0,5 h	keine Messung möglich	Messung nicht zuverlässig (PDI zu hoch, <i>Cumulants Fit</i> und <i>Correlogram</i> ^[85] weichen sehr stark vom idealen Kurvenverlauf ab)	1 min, keine Verbesserung der Größen- verteilung eingetreten
5-15	1	<1000	0,700	380 h			
15-30	2	<1000	1,000	0,5 h			
5-15	2	<1000	1,000	0,5 h			
15-30	3	127	0,396	34 d	-14		ohne
5-15	3	254	0,492	34 d	-8		
15-30	4	163	0,464	280 h	-12		
15-30	4	190	0,303	70 h	-11	Messung zuverlässig	1 min
15-30	4	variierte	0,508	über 70 h	-16	Messung nicht zuverlässig (PDI)	1 min
5-15	4	384	0,465	280 h	-17		ohne
5-15	4	225	0,341	45 h	-13	Messung zuverlässig	1 min
5-15	4	variierte	0,428	über 45 h	-17	Messung nicht zuverlässig (PDI)	1 min
15-30	5	<1000	1,000	120 h	-12		Keine Verbesserung eingetreten
5-15	5	<1000	1,000	120 h	-17		

Die zerschlagenen Agglomerate waren jedoch nur ~70 h in einem dispergiertem Zustand. Später setzte wieder Agglomeration mit anschließender Sedimentation ein. Die Variation der PAsp-Kettenlänge führte zu keinem positiven oder negativen Effekt. Das ζ -Potential lag bei den Proben zwischen -8 und -17 mV, was für eine nicht stark ausgeprägte elektrostatische Stabilisierung der Partikel spricht. Hier sollte die Ladung einen Wert von -30 mV und mehr erreichen. Je höher der Betrag unabhängig vom Vorzeichen ist, desto intensiver ist die elektrostatische Stabilisierung.

Die folgende Abbildung 4.2 zeigt eine REM-Aufnahme einer Probe der Polyasparaginsäure-Reihe mit 20 mL Wasservorlage und 1 mL PAsp-Lösung sowie der Zugabe von je 3 mL Calcium- und Phosphatlösung. Über den dargestellten Größenmaßstab kann leicht ermittelt werden, dass die Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung nicht genau sind, denn die Partikel zeigen keine Größe von rund 130 nm sondern sind zwischen 300 und 500 nm groß.

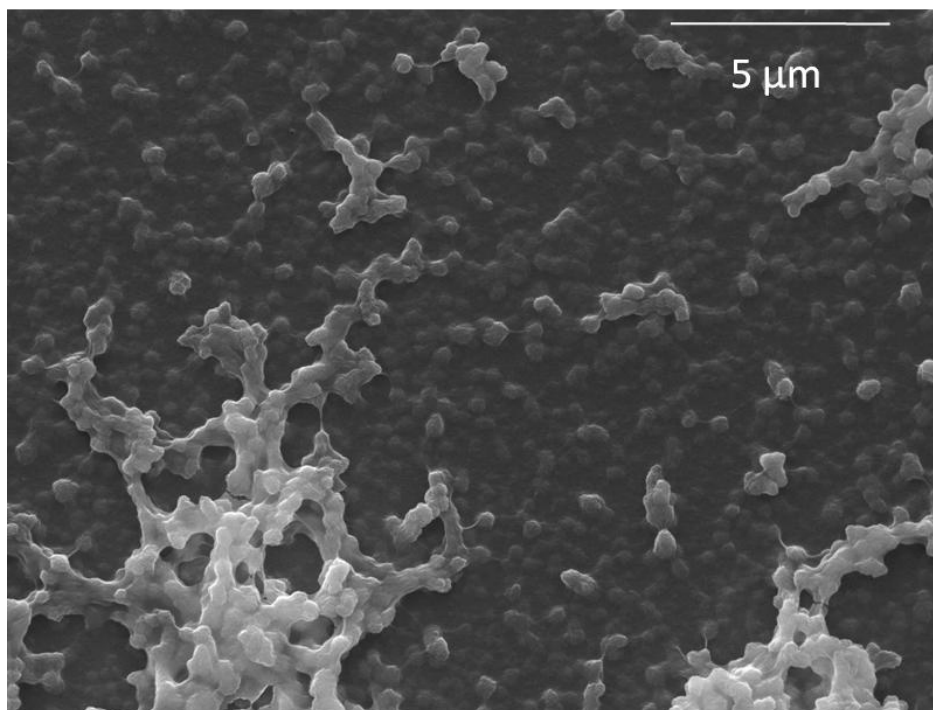


Abbildung 4.2 - REM-Aufnahme einer Probe der PAsp-Reihe mit 20 mL Wasservolumenvorlage, 1 mL PAsp-Lösung und je 3 mL Calcium- und Phosphatlösung (pH 8) zugetropft (Probe nach 30 min Rühren, 15-30 kDa-Kette).

Zeigten die Partikel im REM eine geringere Größe, so wäre es keine Überraschung, denn die DLS misst den hydrodynamischen Radius, der immer größer ist als der Radius des Partikels ohne hydrodynamische Hülle. Abbildung 4.3 zeigt dieselbe Messreihe, jedoch wurde die 5-15 kDa Aminosäure verwendet. Laut DLS sollten die Partikel

doppelt so groß sein, dies ist aber nicht der Fall, denn hier ist die Partikelgröße sehr ähnlich zur langen Kette (zwischen 200 und 450 nm).

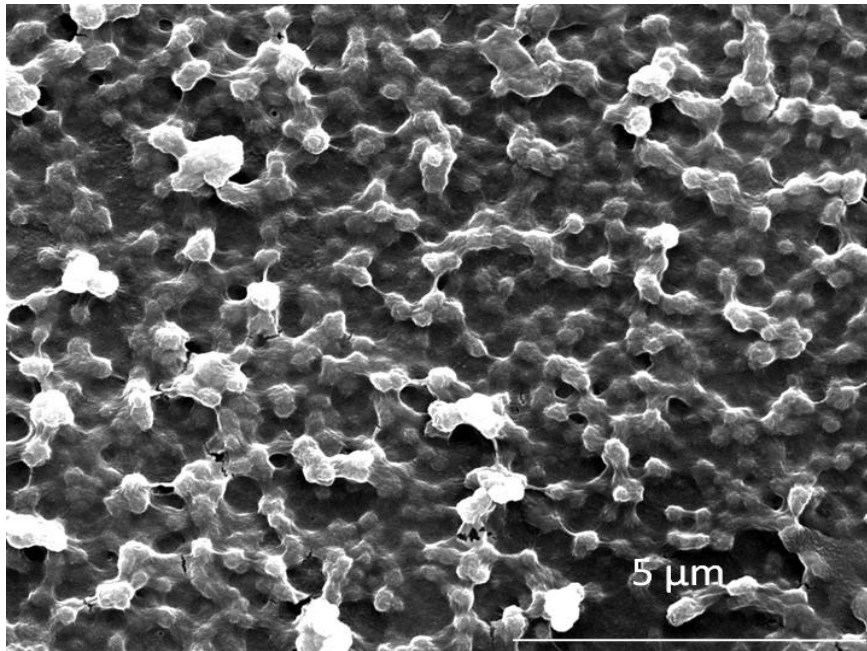


Abbildung 4.3 - REM-Aufnahme einer Probe der PAsp-Reihe mit 20 mL Wasservolumenvorlage, 1 mL PAsp-Lösung und je 3 mL Calcium- und Phosphatlösung zugetropft (pH 8) (Probe nach ~20 Tagen, 5-15 kDa-Kette).

4.1.2.2 Polyasparaginsäure-Reihe mit 30 mL Wasservolumenvorlage

Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse mit einem vorgelegten Wasservolumen von 30 mL. Die Zugabe von je 1 und 2 mL Calcium- und Phosphatlösung ergab ebenfalls wie bei der 20 mL keine stabilen Kolloide. Die Zugabe von 3 bis 5 ml Calcium- und Phosphatlösung jedoch ergab stabile relativ monodisperse Nanopartikel, deren hydrodynamischer Radius im Mittel zwischen 178 und 228 nm lag. Der PDI befand sich zwischen 0,152 und 0,374. Hier erreichten die Proben den gewünschten Bereich. Eine Ultraschallbehandlung war nicht nötig. Der Kettenlänge der PAsp konnte kein eindeutiger Effekt zugeordnet werden. Lediglich die Probe mit der 4 und 5 mL Zugabe konnte einen Unterschied aufzeigen, denn bei der langen Kette lag der PDI deutlich unter der Probe mit der kurzen Kette. Jedoch zeigte die Partikelgröße keinen Trend zu der Kettenlänge. Das ζ -Potential lag bei den Proben zwischen -18 und -21 mV, was für eine deutlich bessere Stabilisierung der Partikel spricht als bei 20 mL Wasservorlage, aber der Wert von -30 mV oder niedriger wurde hier ebenfalls nicht erreicht.

Tabelle 5 - PAsp-Reihe mit 30 mL Wasservorlage

Polyasparaginsäure-Reihe mit 30 mL Wasservorlage und 1 mL PAsp-Lösung						
M (PAsp)	Ca/P- Volumen	Z-Average (nm)	PDI	Zeitraum der durchgeführten	ζ-Potential	Korrekturfaktoren
kDa	mL	Mittelwert	Mittel- wert	Messungen	mV	PDI, <i>Cumulants Fit</i> , <i>Correlogram</i> etc.
15-30	1	230	0,486	20 h	keine Messung möglich	Messung nicht zuverlässig (PDI zu hoch, <i>Cumulants Fit</i> und <i>Correlogram</i> weichen sehr stark vom idealen Kurvenverlauf ab)
5-15	1	381	0,400	20 h		
15-30	2	266	0,482	283 h		
5-15	2	210	0,375	283 h		
15-30	3	228	0,374	81 d	-19	Messung zuverlässig
5-15	3	195	0,286	81 d	-18	
15-30	4	193	0,194	81 d	-21	
5-15	4	178	0,261	81 d	-18	
15-30	5	186	0,152	81 d	-19	
5-15	5	216	0,203	81 d	-18	

Aus Tabelle 5 können keine deutlichen Unterschiede der pH 8 Proben mit einer Zugabe von je 3, 4 und 5 mL Calcium- und Phosphatlösung abgeleitet werden. Daher werden in den Abbildungen 4.4 bis 4.7 die Größenverteilungen dargestellt, welche über die dynamische Lichtstreuung gemessen wurden.

4.1 Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel in wässrigem Medium über Polyamino-säuren

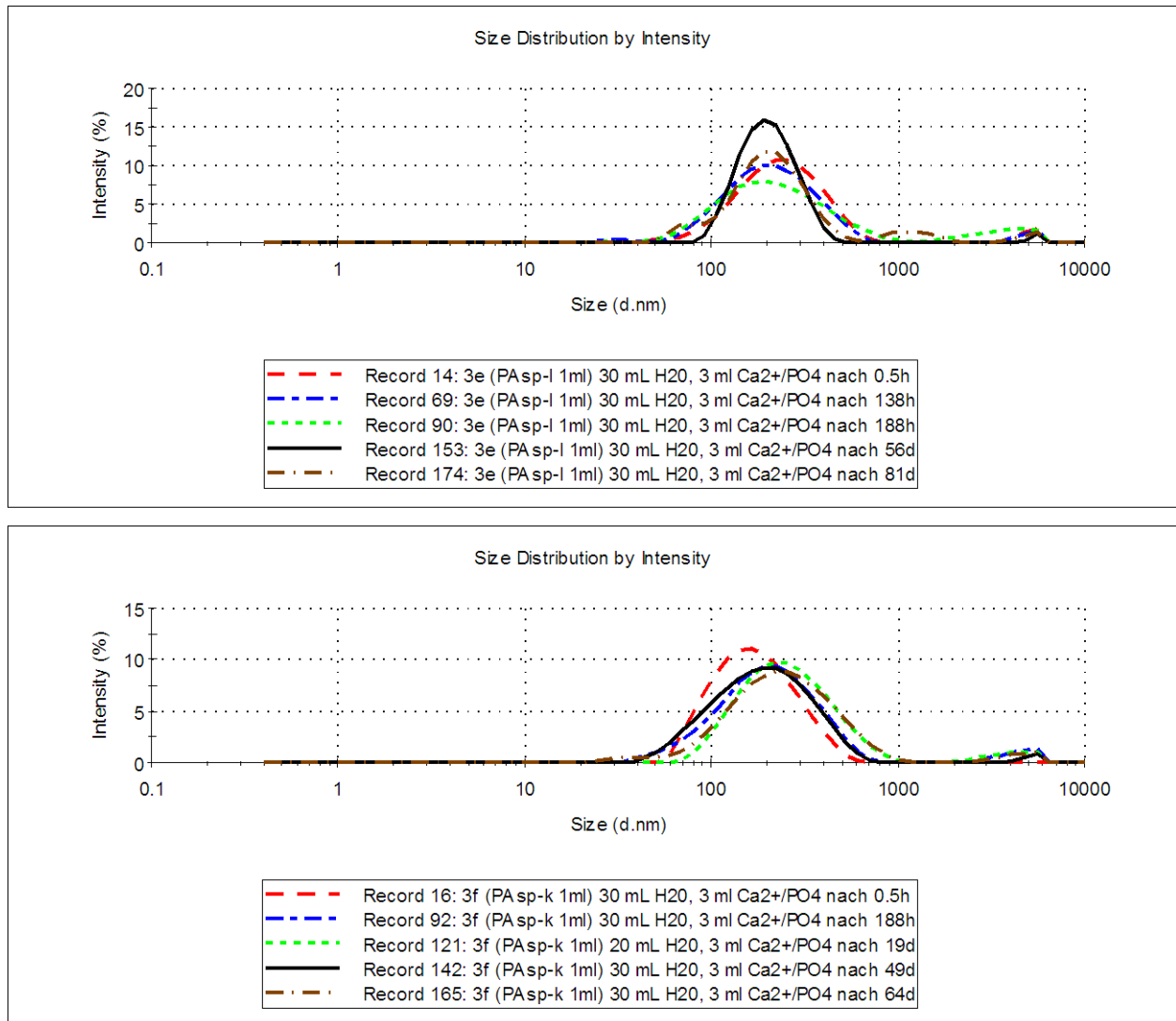


Abbildung 4.4 - Vergleich der Partikelgrößenverteilung von PAsp-Proben mit 5-15 kDa und 15-30 kDa Ketten (30 mL Wasservorlage und 3 mL Calcium- sowie Phosphatlösungszugabe)

Abbildung 4.4 (unten) zeigt deutlich, dass das Größenmaximum für die Reihe mit der 5-15 kDa PAsp-Kette einen höheren Wert aufweist als Abbildung 4.4 (oben), denn es liegt deutlich über 200 nm. Des Weiteren ist die Größenverteilung bei der Probe mit der 5-15 kDa PAsp-Kette homogener. Auch die Intensität des Maximums ist bei Abbildung 4.4 (unten) gleichmäßiger. Im Vergleich zu Abbildung 4.5 sind die Ergebnisse nicht so einheitlich und variieren viel deutlicher.

4.1 Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel in wässrigem Medium über Polyaminosäuren

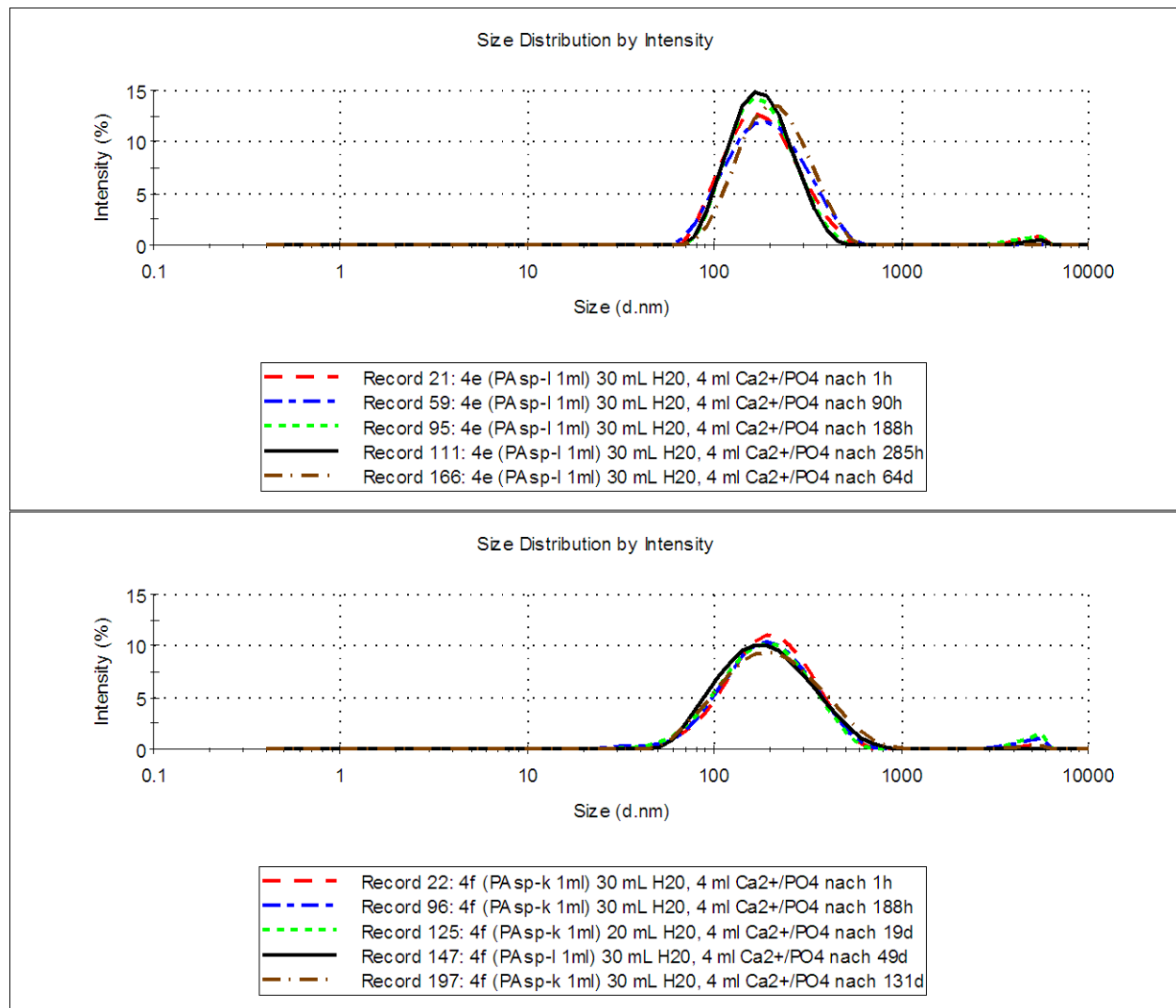


Abbildung 4.5 - Vergleich der Partikelgrößenverteilung von PAsp-Proben mit verschiedenen Kettenlängen (30 mL Wasservorlage und 4 mL Calcium- sowie Phosphatlösungszugabe)

Abbildung 4.5 zeigt für die lange und die kurze Kette der PAsp gleichmäßige, wenig variierende Größenverteilungen. Dieser Probe wurden 4 mL Calcium- und Phosphatlösung zugegeben, was sich hier als sinnvollste Variation der Versuchsbedingungen herausstellte. Die Kettenlängen haben einen deutlichen Einfluss auf die Breite der Verteilung. Die lange Kette in Abbildung 4.5 (oben) hat eine schmalere Verteilung, was erwünscht ist und daher als positiver Aspekt betrachtet werden kann, genau wie die stärkere Intensität des Größenmaximums. Andererseits ist die Intensität der Größenverteilung der kurzen Kette in Abbildung 4.5 unten gleichmäßiger. Es kann folglich keine Aussage darüber getroffen werden, welche der Kettenlängen optimal ist.

4.1 Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel in wässrigem Medium über Polyaminosäuren

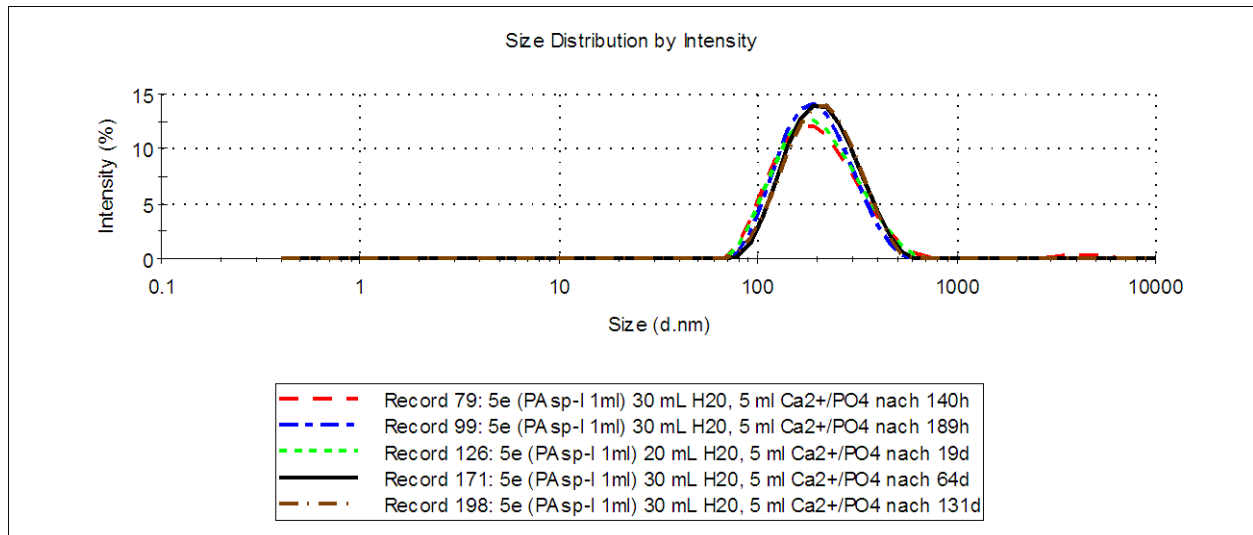


Abbildung 4.6 - PAsp-Reihe (lange Kette) mit 30 mL Wasservorlage, nach 5 mL Calcium- und Phosphatlösungszugabe, Partikelgrößenverteilung

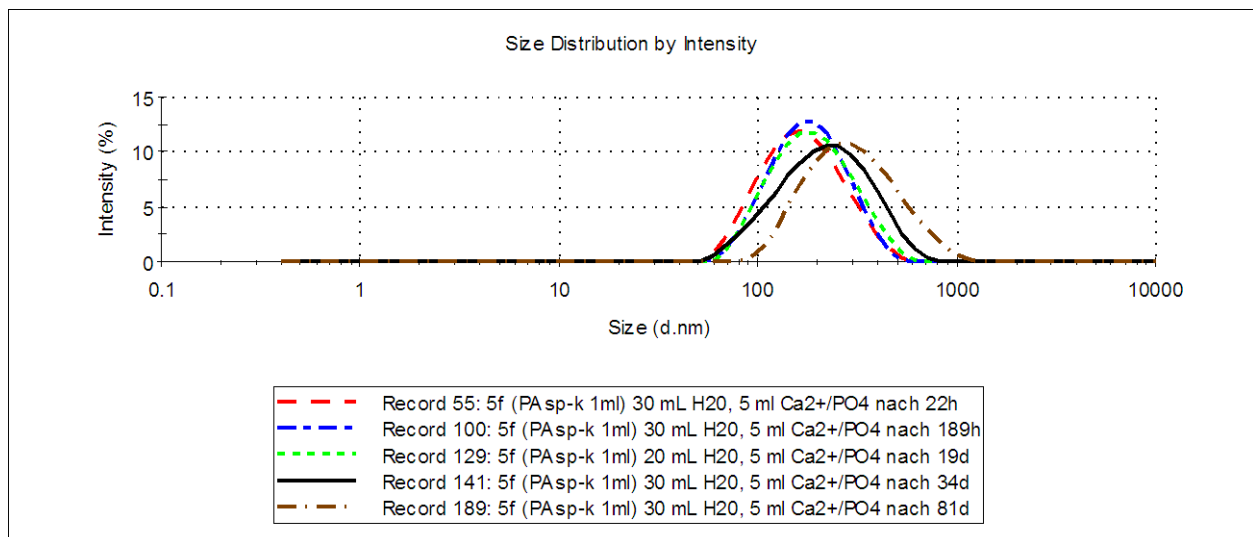


Abbildung 4.7 - PAsp-Reihe (kurze Kette) mit 30 mL Wasservorlage, nach 5 mL Calcium- und Phosphatlösungszugabe, Partikelgrößenverteilung

Abbildung 4.6 und 4.7 zeigen eine Probe, der je 5 mL Calcium- und Phosphatlösung zugegeben wurden. Hier ist zwischen kurzer und langer Kette ein deutlicher Unterschied zu sehen. Die lange Kette (Abbildung 4.6) zeigt eine schmalere, gleichmäßigere Verteilung bei teilweise stärkerer Intensität. Abbildung 4.7 zeigt nach 34 Tagen eine Zunahme der Größenverteilung unter Verbreiterung des Signales; die Destabilisierung setzt langsam ein. In dem REM-Bild von Abbildung 4.8 zeigen sich deutlich die kleineren Partikel der Reihe welche auch bei 6 Tage alten Proben noch vorhanden sind. Die Größe der Partikel liegt hier zwischen 150 und 250 nm. Dies passt

sehr gut zu den Ergebnissen der Größenverteilung, gemessen in der dynamischen Lichtstreuung (siehe Abbildung 4.6 / 4.7).

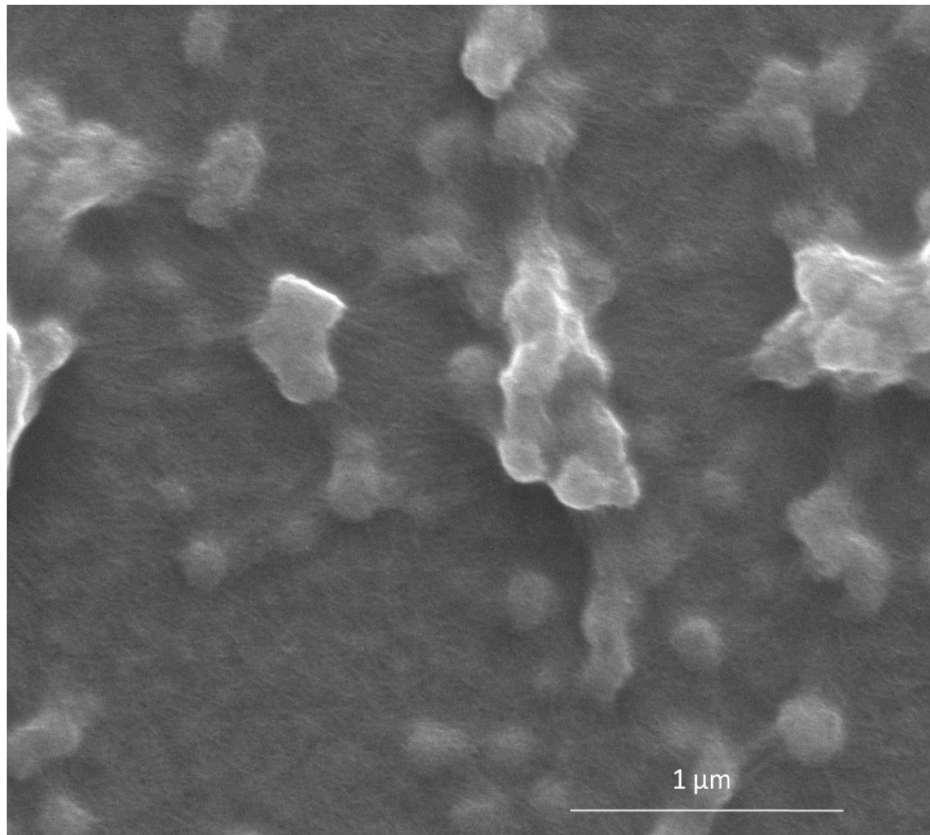


Abbildung 4.8 - Typische Morphologie der PAsp-Reihe (Wasservolumen 30 mL, 1 mL der langkettigen PAsp-Lösung und je 5 mL Calcium- und Phosphatlösungszugabe).

4.1.3 Polylysin-Reihe

Die Polylysin-Reihe (PLys) wurde nahezu analog zur PAsp-Reihe durchgeführt, jedoch wurde auf die 30 mL Wasservorlage verzichtet. Die kurze Kette der PLys hat eine Molmasse von 4-15 kDa, die lange von 15-50 kDa. Das zugetropfte Volumen der ebenfalls vor der Zugabe auf pH 8 eingestellten Calcium- und Phosphatlösungen wurde zwischen je 1 und 4 mL variiert. Nach der Zugabe aller Komponenten wurde 30 min gerührt. Die pH-Werte der PLys-Lösung des Hydrochlorides der Aminosäure betrug für die 4-15 kDa Kette $5,1 \pm 0,08$. Nach der Zugabe der Calcium- und Phosphatlösungen und dem Rühren lag der pH-Wert aller Proben bei $7,4 \pm 0,5$. Bei einsetzender Flockung des Calciumphosphates sank der pH-Wert um $0,5 \pm 0,1$ im Vergleich zu den anderen Proben. Die Proben mit der 15-50 kDa Kette hatten ohne Calciumphosphatzugabe einen pH-Wert von $5,6 \pm 0,16$. Nach den Calcium- und Phosphatlösungszugaben und 30 min Rühren lag der pH-Wert aller Proben bei $7,5 \pm 0,15$.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel in wässrigem Medium über Polyaminosäuren

Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse der verschiedenen Messungen der Proben. Ähnlich wie bei den Ergebnissen der PAsp-Reihen stellen sich die Proben mit einem größeren Volumen an zugegebener Calcium- und Phosphat-Lösung als stabiler und einheitlicher heraus. Interessant bei den Ergebnissen ist, dass die Ultraschallbehandlung kaum eine Veränderung hervorgerufen hat.

Tabelle 6 - PLys-Reihe mit 20 mL Wasservorlage

Polylysin-Reihe mit 20 mL Wasservorlage und 1 mL PLys-Lösung							
M (PLys)	Ca/P- Volumen	Z- Average	PDI	Zeitraum der durchge- führten Messungen	ζ-Potential mV (Mittelwert)	Korrektur- faktoren PDI, <i>Cumulants Fit, Correlogram</i> etc.	Ultra- schall
kDa	mL	Mittel- wert	Mittel- wert				Dauer
15-50	1	416	0,466	19 h	keine Messung möglich	Messung nicht zuverlässig (PDI zu hoch, <i>Cumulants fit</i> und <i>Correlogram</i> weichen sehr stark vom idealen Kurven- verlauf ab)	ohne
4-15	1	592	0,535	19 h			ohne
15-50	2	248	0,415	139 h	16		ohne
15-50	2	602	0,580	5 d	25		1 min
4-15	2	459	0,452	139 h	keine Messung möglich		ohne
4-15	2	440	0,387	5 d	27		1 min
15-50	3	264	0,216	140 h	27		ohne
15-50	3	280	0,210	131 d	30	Messung zuverlässig	1 min
4-15	3	283	0,375	140 h	31		ohne
4-15	3	275	0,243	131 d	32		1 min
15-50	4	196	0,204	140 h	31		ohne
15-50	4	188	0,190	131 d	34		1 min
4-15	4	680	0,394	140 h	30		ohne
4-15	4	397	0,285	131 d	34		1 min

4.1 Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel in wässrigem Medium über Polyaminosäuren

Dies kann auf eine einheitliche nicht verzweigte Partikelstruktur zurückgeführt werden. Es scheinen wesentlich weniger Agglomerate von Nanopartikeln vorzuliegen. Bei der PLys-Reihe gibt es einen eindeutigen Trend mit der Kettenlänge. Die 15-50 kDa-Kette liefert in dieser Reihe die stabileren Partikel. Die Proben mit 1 und 2 mL Calcium und Phosphatlösungszugabe ergaben für beide Kettenlängen keine stabilen und kleinen Partikel. Erst die 3 mL Calcium- und Phosphatlösungs-Proben führte mit beiden Kettenlängen zu einer Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel. Hier wurden Partikel mit einem hydrodynamischen Radius von 260 bis 280 nm gebildet. Über die DLS wurden für die kurze 4-15 kDa Probe größere polydispersere Partikel gemessen als für die lange (15-50 kDa) Kette. Werden jedoch 4 mL Calcium- und Phosphatlösung zugegeben, so kommt es zu einer deutlicheren Veränderung der Stabilität, was offensichtlich mit der Kettenlänge zusammenhängt, denn die lange Kette führt zu deutlich kleineren Nanopartikeln mit einem hydrodynamischen Radius von unter 200 nm. Bei der kurzen Kette kommt es zur Agglomeration. Es werden wesentlich größere Partikel gebildet, deren Durchmesser mit der Hilfe eines Ultraschallbades im Mittel halbiert werden können. Jedoch bleiben sie trotzdem noch gut doppelt so groß wie die Partikel, welche mit der langen Kette stabilisiert wurden. Nach der Ultraschallung steigt das Potential auf 30-34 mV an. Der Trend für die Kettenlänge ist für die Übertragung auf die Proteine ein wichtiger Aspekt, da Proteine oft um ein Vielfaches größer als 50 kDa sind.

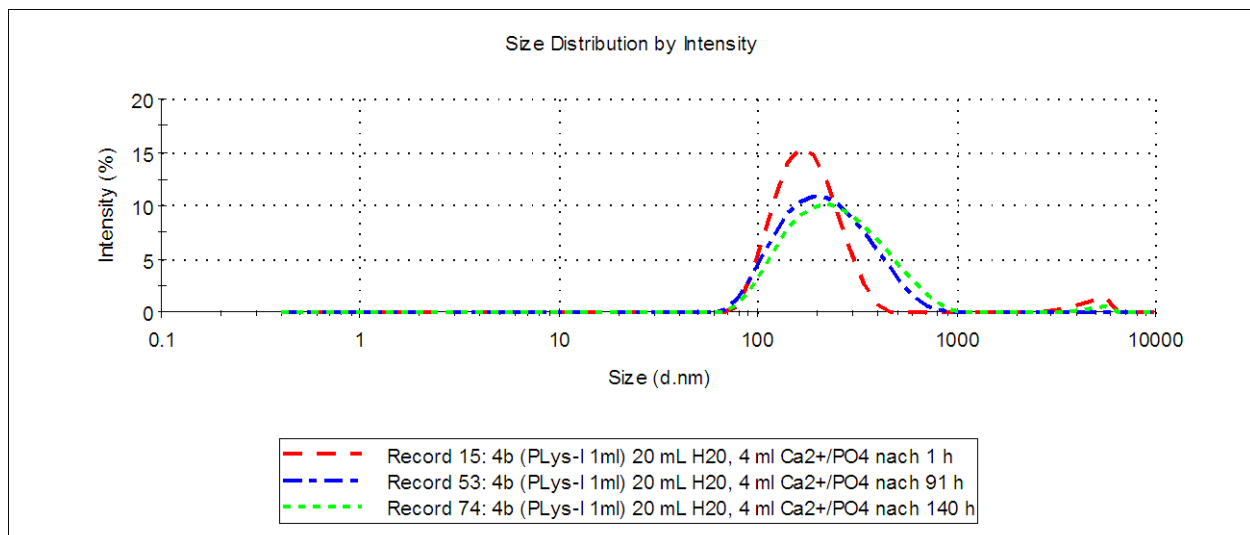


Abbildung 4.9 - Größenverteilung der PLys-Reihe (lange Kette) mit einer Calcium- und Phosphatlösungszugabe von 4 mL, ohne Ultraschallbehandlung

Abbildung 4.9 zeigt die Größenverteilung der PLys-Reihe (lange 15-50 kDa Kette, Calcium- und Phosphatlösungszugabe von 4 mL), vor der Ultraschallbehandlung. Aus dem Diagramm kann eine Verbreiterung der Größenverteilung mit steigendem Alter abgelesen werden. Daher wurde hier eine 1 minütige Ultraschallbehandlung durchgeführt, was zu einer Veränderung der Größenverteilung führte. Der hydrodynamische Radius der Nanopartikel nahm im Mittel von 230 nm auf 200 nm ab. Abbildung 4.10 zeigt die Probe nach der Ultraschallbehandlung. Üblicherweise ist eine solche Behandlung ein reversibler Prozess, denn Agglomerate werden zwar kurzfristig zerstört, bilden sich aber schnell wieder erneut aus. So stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Nanopartikeln und Agglomeraten ein. Bei der PLys-Reihe führte die einmalige Ultraschallbehandlung jedoch zu einer langhaltigen Inhibierung der Agglomeration, was für eine geschlossene Schale auf der Oberfläche der Nanopartikel spricht. Denn wäre diese nicht geschlossen, so könnten sich die Calciumphosphat-Nanopartikel wieder aneinander anlagern und Agglomerate zurückbilden. Über den Messzeitraum von 131 Tagen trat dies nicht auf.

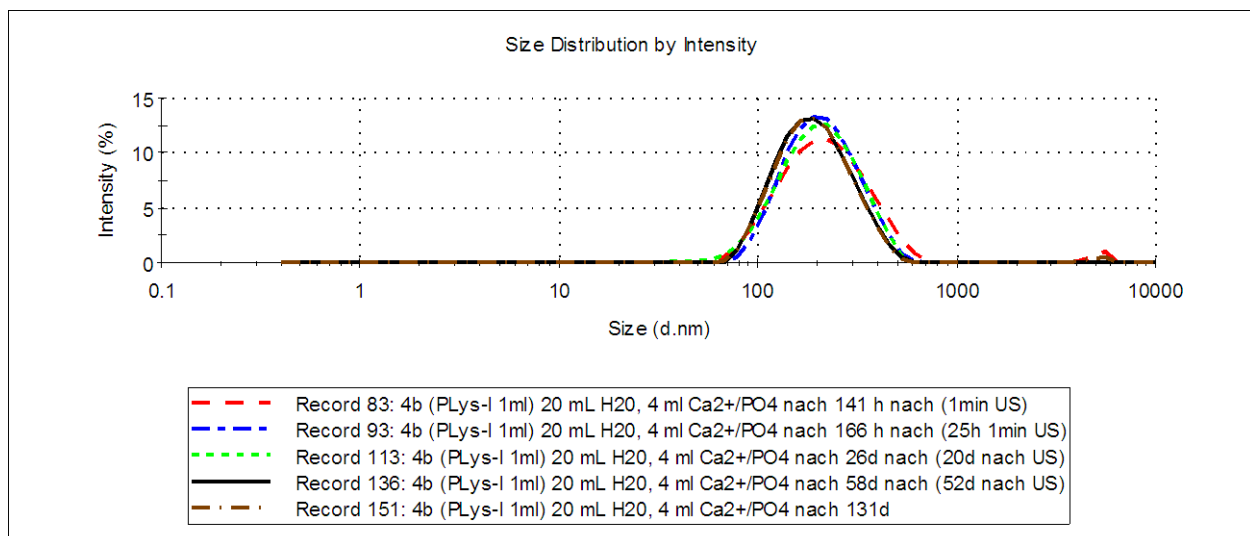


Abbildung 4.10 - Größenverteilung der PLys-Reihe (lange Kette) mit einer Calcium- und Phosphatlösungszugabe von 4 mL, nach Ultraschallbehandlung

Abbildung 4.11 zeigt eine REM-Aufnahme der PLys-Reihe (lange Kette) mit 4 mL Calcium- und Phosphatlösungszugabe. Auffällig ist die völlig andere Struktur der Nanopartikel, denn hier liegen sie nicht als sphärische, sondern als stäbchen- oder sternförmige Partikel vor. Die Länge dieser Partikel ist aufgrund der starken Verwachsung nur schwer zu bestimmen. Der über dynamische Lichtstreuung bestimmte hydrodynamische Radius der Nanopartikel zwischen 200 und 300 nm scheint in diesem

Fall auch zutreffend zu sein, vor allem, wenn berücksichtigt wird, dass die DLS von sphärischen Partikeln ausgeht, was hier zu einem deutlichen Fehler führt.

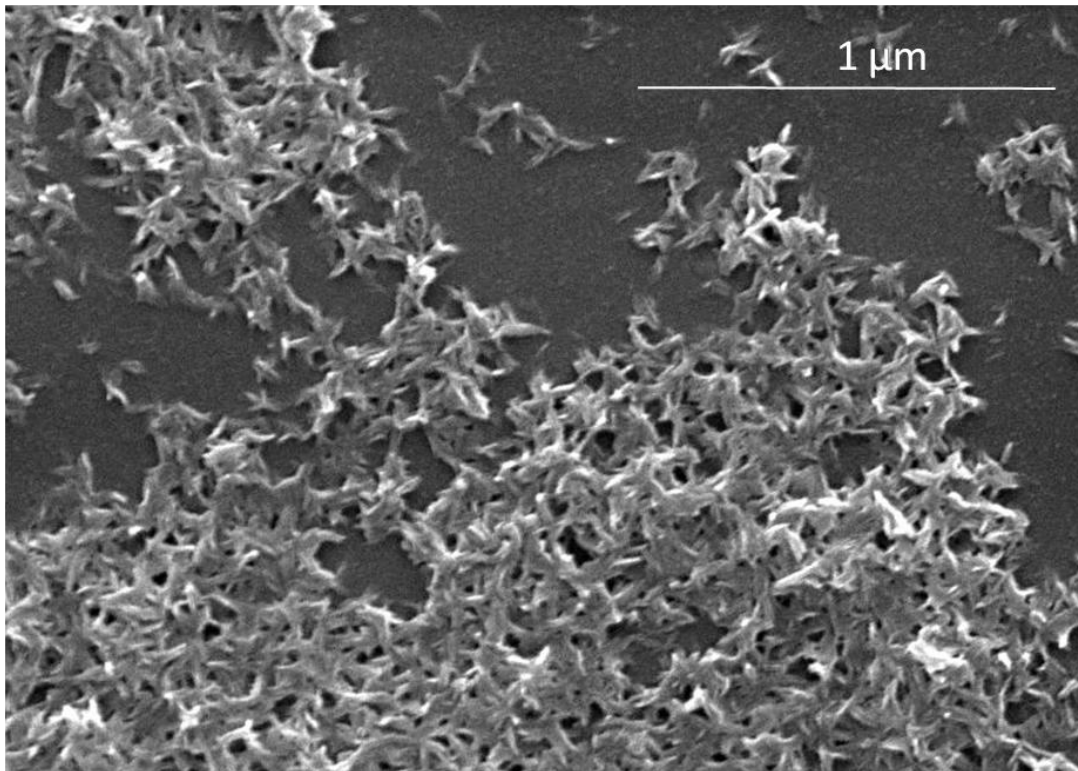


Abbildung 4.11 - REM-Aufnahme mit höherer Auflösung und Vergrößerung der Nanopartikel einer PLys-Reihe (4 mL Calcium- und Phosphatlösung) nach ~6 Tagen.

4.1.4 Zusammenfassung und Diskussion der Polyaminosäure-Reihen

Die PAsp-Reihe hat ihr Optimum bei der Vorlage von 30 mL Wasser und der Zugabe von 4 mL Calcium- und Phosphatlösung. Proben mit einer höheren oder niedrigeren Menge an Calcium und Phosphat zeigen stärkere Variationen in Partikelgröße, Partikelverteilung und Intensität bzw. stark ausgeprägte nicht reversible Agglomeration. Unter den günstigsten Bildungsbedingungen konnten mit der 15-30 kDa-PAsp in der DLS eine Partikelgröße von ca. 120 nm mit einem PDI von 0,4 gemessen werden, welche ~1 Monat stabil waren (REM 300-500 nm). Die 5-15 kDa-PAsp ergab 190 nm große Partikel mit einem PDI von ~0,5, welche nur ca. 70 Stunden stabil waren. Die Kettenlänge der Polyaminosäure hat keinen eindeutigen Einfluss, aber bei der Zugabe von je 5 mL Calcium und Phosphatlösung ist nur noch die lange Kette für eine einheitliche Verteilung tauglich. Somit kann die Aussage getroffen werden, dass die Kettenlänge keinen nachvollziehbaren Einfluss auf die Größe der gebildeten Nanopartikel hat. Jedoch ist insgesamt betrachtet die längere Kette besser zur

Stabilisierung geeignet. Bei der Dynamischen Lichtstreuung zeigten die Proben mit der längeren Kette eine einheitlichere Größenverteilung.

Die PLys-Reihe zeigt eine optimale Stabilität der langen Kette bei der Vorlage von 20 mL Wasser, der Zugabe von 4 mL Calcium- und Phosphatlösung. Proben mit einer niedrigeren Menge an Calcium und Phosphat oder der kurzen Kette zeigen stärkere Variationen in Partikelgröße, Partikelverteilung und Intensität bzw. stark ausgeprägte nicht reversible Agglomeration. Die 15-50 kDa-PLys Proben lieferten in der DLS deutlich kleiner Partikel. Bei optimalen Bedingungen (4 mL Calcium- und Phosphatlösung) wurden unter 200 nm große Nanopartikel mit einem PDI von 0,2 gemessen, welche über 130 Tage stabil waren. Die kurze Kette (4-15 kDa) führte im besten Falle zu 260 bis 280 nm Partikeln (PDI 0,375) welche allerdings genauso lange stabil waren (~130 Tage).

Der Betrag des ζ -Potentials der PLys-Reihe liegt mit +30 mV deutlich höher als bei der PAsp-Reihe (-18 mV). Die Calciumphosphatabdeckung mit der PAS scheint bei der PAsp-Reihe (30 mL Wasser) und PLys-Reihe (20 mL Wasser) optimal zu sein. Da keine Agglomerate entstehen, ist es nicht so verwunderlich, dass die Ultraschallbehandlung keine Größenveränderung hervorruft. Bei der PAsp-Reihe mit 20 mL Wasservorlage konnte die Ultraschallbehandlung die Ergebnisse zwar verbessern, aber die Stabilität und Größe der Partikel waren noch nicht optimal.

Die Erkenntnis, dass die lange Kettenlänge besser stabilisierend wirkt als die kurze, ist wichtig für die Verwendung von Proteinen, denn die Molmasse von Proteinen ist üblicherweise wesentlich größer als die Molare Masse der kurzen Kette beider PAS.

4.2 Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel in wässrigem Medium über Modellproteine

Nachdem Calciumphosphat-Nanopartikel mit den Polyaminosäuren PLys und PAsp erfolgreich stabilisiert wurden, sollten die Ergebnisse genutzt werden, um die Nanopartikel mit Proteinen zu stabilisieren. Hierzu wurden BSA, Lysozym und Ubiquitin verwendet.

4.2.1 BSA-Reihe

In der ersten Versuchsreihe der Stabilisierung von Calciumphosphat-Nanopartikeln direkt über Proteine wurden nahezu alle möglichen Parameter variiert: Das Volumen der Proteinlösung mit einer Konzentration von 1 und 2 g L⁻¹, die Calcium- und Phosphatmengen zugabe sowie deren pH-Werte (8 und 9), lediglich das vorgelegte Volumen von 30 mL wurde nicht verändert.

Tabelle 7 - BSA-Reihe mit auf pH 8 eingestellter Calcium- und Phosphatlösung

BSA-Reihe mit auf pH 8 eingestellter Calcium- und Phosphatlösung		
Calcium- und Phosphatlösungsmenge	BSA Konzentration	pH-Werte (vor / nach Calciumphosphatzugabe)
je mL	je 1 mL	
1	1 g L ⁻¹	BSA in Wasser: pH: 6,8±0,3 pH-Wert nach der Zugabe: 7,5±0,15
2		
3		
4		
5		
1	2 g L ⁻¹	BSA in Wasser: pH: 6,5±0,36 pH-Wert nach der Zugabe: 7,7±0,18
2		
3		
4		

Die auf pH 8 eingestellten Calcium- und Phosphatlösungen konnten keinerlei stabile Dispersionen mit BSA bilden. Alle angesetzten Proben, dargestellt in Tabelle 7, lagerten sich zu großen Agglomeraten zusammen oder flockten sofort aus. Daher wurden die

pH-Werte modifiziert und auch die Konzentrationen an zugegebenem BSA stärker variiert.

Tabelle 8 - BSA-Reihe mit auf pH 9 eingestellter Calcium- und Phosphatlösung

BSA-Reihe mit auf pH 9 eingestellter Calcium- und Phosphatlösung				
Calcium- und Phosphat-lösungsmenge	BSA-Menge (1 g L ⁻¹)	Z-Average (teilweise Mittelwerte*)	PDI	Längste Lebensdauer stabiler Partikel
je mL	in mL	in nm		
1	1,0	267	0,358	1 d
2	1,0	529	0,380	30 min
3	1,0	<1000	0,885	30 min
4	1,0	<1000	1,000	30 min
5	1,0	<1000	1,000	30 min
1	0,5	210	0,282	30 min
1	1,0	270*	0,387	4 d
1	1,5	193*	0,243	30 min
1	2,0	198	0,280	30 min

Die pH 9-Reihe ist in der Tabelle 8 wiedergegeben. Sie zeigt in der oberen Hälfte die Proben mit konstanter BSA-Menge und variiert Calcium- und Phosphatlösungsmenge. Die Proben ohne Variation der BSA-Menge ergaben nach der Zugabe des Proteins einen pH-Wert von $7,0 \pm 0,1$, mit Variation der BSA-Menge lag der pH-Wert bei $6,7 \pm 0,1$. Nach der Zugabe der Calcium- und Phosphatlösungen (pH 9) und 30 min Rühren lag der pH-Wert ohne BSA-Mengenvariation bei $7,8 \pm 0,13$ und mit BSA-Mengenvariation bei $8,1 \pm 0$. Die Probe mit der geringsten Menge an Calciumphosphat zeigte Partikel, die klein und relativ monodispers waren. Die anderen Proben agglomerierten sofort, auch die erste Probe war nicht lange stabil, eine Untersuchung mittels DLS zeigte nach 18 h schon Agglomeration. Daher wurden die Mengen der Calcium- und Phosphatlösungen bei je 1 mL belassen, aber die BSA-Menge variiert. Hier zeigte sich, dass eine Zugabe von 0,5 mL BSA-Lösung zu kleineren Partikeln führte. Sie besaßen einen hydrodynamischen Radius von ~210 nm und konnten aufgrund eines akzeptablen PDIs als zuverlässig betrachtet werden. Ein größeres Volumen an zugegebener BSA-Lösung von 1,5 und 2,0 mL ergab ebenfalls kleinere Partikel, jedoch war die Stabilität ähnlich gering, so dass die Proben innerhalb der

ersten 24 h ebenfalls agglomerierten. Somit konnte hier eine ausreichende Stabilität nicht erreicht werden.

Leider konnte auch mit entsprechend variierten Proben bei pH 10 keine Stabilität von mehr als ein paar Stunden erreicht werden. Die Probe mit je 1 mL Calcium-, Phosphat und BSA (1 g L^{-1}) führten bei diesem pH-Wert zu Partikeln mit einer Größe von $\sim 180 \text{ nm}$ bei einem PDI von 0,33. Dies bedeutet, dass auch hier eine relativ uneinheitliche Größenverteilung vorlag, da der PDI den Wert 0,3 schon überschritten hat und die Abweichung von der Funktion des *cumulants fit* und des *correlogram* so stark war, dass die Messung der Probe durch Agglomerate als stark fehlerbehaftet gewertet werden muss. Diese Aussage gilt für alle BSA-stabilisierten Partikel, die älter als ein Tag waren.

4.2.2 Lysozym-Reihe

Die Stabilisierung von Calciumphosphat-Nanopartikeln über Lysozym konnte mit keinem positiven Ergebnis abgeschlossen werden. Das vorgelegte Volumen von 30 mL Wasser ergab bei Calcium- und Phosphatlösungs-pH-Werten von 7 und 8 und verschiedenen Calcium-, Phosphat- und Proteinlösungsverhältnissen keine Partikel mit einem PDI unter 0,3. Daher konnten keine der Messungen mit aussagekräftigen Ergebnissen erzielt werden. Das ζ -Potential konnte aufgrund des hohen PDI's, der in nahezu allen Fällen meist deutlich über 0,4 lag, nicht sicher bestimmt werden.

Tabelle 9 ist zu entnehmen, dass die Proben mit pH 7 und 8 mit DLS untersucht wurden, jedoch wie oben beschrieben mit polydispenser Partikelverteilung. Die pH Werte 9 und 10 führten in allen angesetzten Proben noch innerhalb des 30 min Rührens zu Niederschlägen und wurden daher nicht untersucht. In diesen Fällen sank der pH-Wert um $0,6 \pm 0,1$ im Vergleich zu den anderen Proben. Auch eine Ultraschallbehandlung aller Proben konnte die Agglomeration nicht unterbinden, auch nicht für kurze Zeit inhibieren. Die REM-Bilder konnten jedoch die Anwesenheit von Nanopartikeln belegen. Die Größe dieser Partikel lag zwischen 300 und 500 nm.

Tabelle 9 - Durchgeführte und mit DLS untersuchte Lysozym-Reihen

Durchgeführte Lysozym-Reihen			
Calcium- und Phosphat-lösungsmenge	Lysozym-Menge	pH-Werte vor und nach der Zugabe	
je mL	je 1 mL	pH 7	pH 8
1 (pH 7 und 8)	1 g L ⁻¹	6,5±0,3 (nur Protein) 7,2±0,05 nach Rühren	5,8±0,2 (nur Protein) 7,8±0 nach Rühren
2 (pH 7 und 8)			
3 (pH 7 und 8)			
4 (pH 7 und 8)			
5 (pH 7 und 8)			
1 (pH 7)	2 g L ⁻¹	5,2±0 (nur Protein) 7,2±0,1 nach Rühren	
2 (pH 7)			
3 (pH 7)			
4 (pH 7)			
5 (pH 7)			

Die in Abbildung 4.12 gezeigten Nanopartikel wurden mit 1 g L⁻¹ Lysozymlösung und auf pH 8 eingestellten Calcium- und Phosphatlösungen hergestellt. Es wurden hier 4 mL der beiden Lösungen zugetropft. Neben den im REM-Bild sichtbaren Nanopartikeln sind auch überschüssiger Hydroxylapatit und Natriumchloridkristalle und bis zu 10 µm große Agglomerate sichtbar, welche nicht in Abbildung 4.12 sichtbar sind, aber in anderen Bildern derselben Probe zu finden waren. Als problematisch stellte sich die Anwesenheit verschiedener Verunreinigungen (NaCl und nicht stabilisiertes Calciumphosphat) heraus. Des Weiteren waren die Dispersionen nicht stabil (wie oben beschrieben) und agglomerierten schnell, was zur Sedimentation der Agglomerate führte. Die Stabilität war also nur begrenzt, denn die älteste Probe, die im REM noch Nanopartikel zeigte, hatte ein Alter von rund drei Tagen.

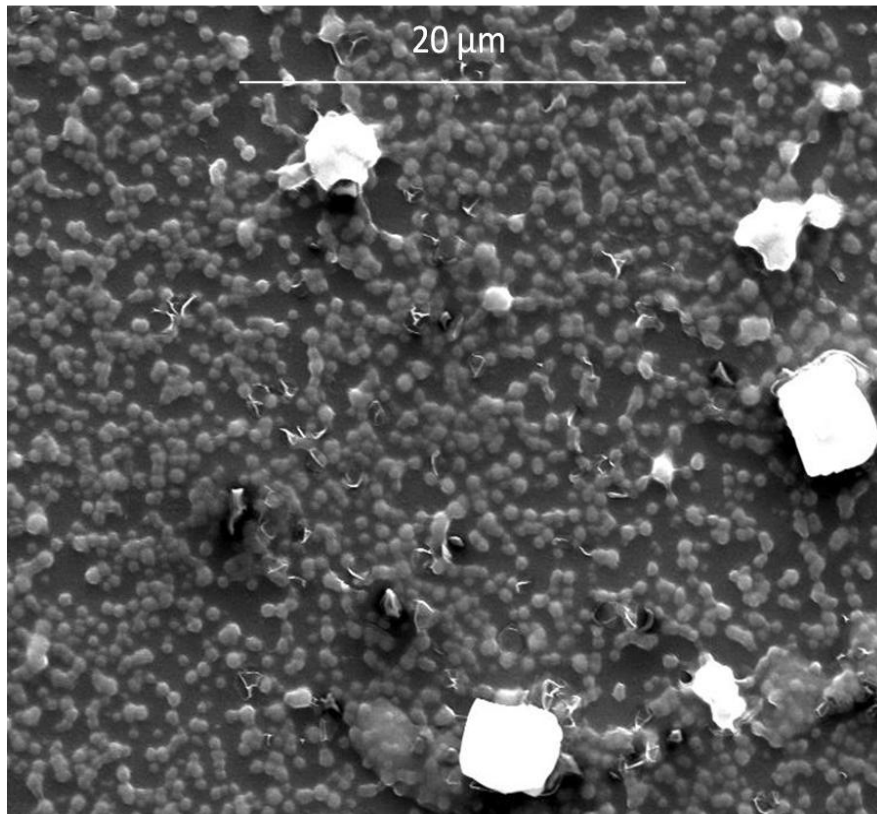


Abbildung 4.12 - REM-Aufnahme der Lysozym-Calciumphosphat Nanopartikel, die bei pH 8 hergestellt wurden

4.2.3 Ubiquitin-Reihe

Die Stabilisierung von Calciumphosphat-Nanopartikeln über Ubiquitin (Tabelle 10) konnte mit keinem positiven Ergebnis abgeschlossen werden. Die Ergebnisse waren ähnlich schlecht wie bei der Verwendung des Lysozyms. Das vorgelegte Volumen von 30 mL Wasser ergab bei Ca/P-Lösungs-pH-Werten zwischen 7 und 10 und verschiedenen Ca/P und Proteinlösungsverhältnissen keine Partikel mit PDI unter 0,3 **und** einer Größe unter 1000 nm. Das ζ -Potential konnte aufgrund des hohen PDI's nicht zuverlässig bestimmt werden. Die pH-Werte von 7 bis 9 führten ebenfalls wie bei Lysozym noch während des Rührens zu Niederschlägen, die ebenfalls nicht mit Ultraschall zerstört werden konnten. Hier lagen die pH-Werte nach dem Rühren um $0,5 \pm 0,1$ Einheiten niedriger.

Tabelle 10 - Durchgeführte und mittels DLS untersuchte Ubiquitin-Reihe

Durchgeführte Ubiquitin-Reihe		
Calcium- und Phosphat-lösungsmenge	Ubiquitin-menge	pH-Werte vor und nach der Zugabe
mL	je 1 mL	
1 (pH 7, 8, 9)	1 g L ⁻¹	Nur Protein: 6,1±0,26 pH 7 Zugabe: 7,0±0,08 pH 8 Zugabe: 7,6±0,1 pH 9 Zugabe: 7,9±0,1
2 (pH 7, 8, 9)		
3 (pH 7, 8, 9)		
4 (pH 7, 8, 9)		
5 (pH 7, 8, 9)		

REM-Bilder zeigten auch wie bei Lysozym trotz schlechter DLS-Ergebnisse die Anwesenheit von Nanopartikeln. Die massive Anwesenheit von Calciumphosphat- und Natriumchlorid-Kristallen sowie großen Agglomeraten, wie in Abbildung 4.13 sichtbar, belegt jedoch trotzdem eine mangelhafte Stabilisierung. Die Nanopartikel waren nur in Proben sichtbar, die direkt nach dem Rühren abgenommen wurden.

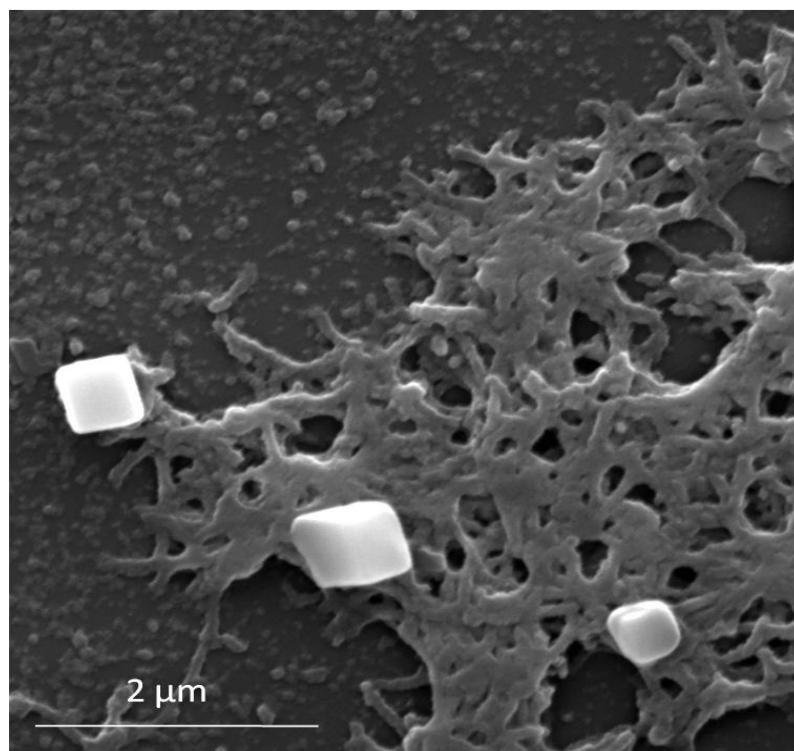


Abbildung 4.13 - Ubiquitin-Calciumphosphat Nanopartikel nach 30 min und einer Zugabe von je 2 mL Calcium- und Phosphatlösung

4.2.4 Stabilisierung von Calciumphosphat-Nanopartikeln in NaCl-Lösung mit Modell-Proteinen

Nach dem Misserfolg bei der Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel mit den Modell-Proteinen wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, bei deren Herstellung der Kolloide in einer 0,25 M NaCl-Lösung ablief. Die Ursache für die nicht erfolgte Stabilisierung könnte in der unregelmäßigen Verteilung der Ladungen in einem Protein liegen. Wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben sind die Proteine bedingt durch eine spezifische AS-Sequenz verschieden und sehr unregelmäßig geladen, anders als eine PAS, die immer eine bestimmte Ladung pro Einheit hat, ähnlich wie ein Polymer. Hier sollte der Versuch unternommen werden, diese Ladungsungleichheiten zu kompensieren, indem Ionen vorgelegt werden, die sich an die geladenen Stellen der Proteine lagern. Im idealen Fall wird die Ladung der Bereiche auf „nur“ zwei Ladungstypen reduziert. An alle positiven Ladungen des Proteins lagern sich nun Chloridionen an und an alle negativen Regionen lagern sich die Natriumionen an. Somit sollten die Ladungsebenen des Proteins gleichmäßiger werden. Es wird sich somit eine Art Ionenwolke ausbilden, deren Natur von der Ionenstärke abhängt, die ihrerseits ϵ beeinflusst. Dies sollte dem Protein eine bessere Anlagerung an Calciumphosphat-Nanopartikel ermöglichen.

Da der Einfluss auf die Calciumphosphatfällung nicht klar war, wurde zuerst eine Blindprobenreihe angesetzt, bei der 30 mL der 0,25 M NaCl-Lösung anstatt des Wassers vorgelegt wurde. Es wurden nun verschiedene pH-Werte und zugegebene Mengen von Calcium- und Phosphatlösungen systematisch getestet, um die idealen Fällungsbedingungen herauszufinden.

Tabelle 11 zeigt eine Auflistung der angesetzten Proben und das Einsetzen der Kristallisation des Calciumphosphates. Sie zeigt, dass die Gegenwart von NaCl die Fällung von Calciumphosphat hemmt und verzögert. Bei dem sonst genutzten pH-Bereich von 8 und 9 kam es nur bei sehr hohen Konzentrationen zu einer Ausfällung des Calciumphosphates, daher wurde ein pH-Wert von 10 für die Versuche ausgewählt. Bei diesen Reihen war auffällig, dass die Kristallisation teilweise erst ein oder zwei Stunden nach dem Vermischen erfolgte. Somit wäre hier die Wahrscheinlichkeit größer, dass das vorgelegte Protein genügend Zeit hat, die Kristallisationskeime zu stabilisieren. Dies könnte ein weiteres Problem ausschließen, nämlich, dass die Kristallisation zu schnell abläuft und somit die Stabilisierung nicht ablaufen kann.

Tabelle 11 - NaCl-Vorlage bei der Calciumphosphat-Fällung ohne Proteinzugabe

Untersuchung des Einflusses der Vorlage einer 0.25 M NaCl-Lösung während der Calciumphosphat-Fällung ohne Proteinzugabe					
pH	Volumen an Calcium- und Phosphatlösung in mL	Beobachtung nach 30 min. rühren	Beobachtung nach 1 h	Beobachtung nach 2 h	Beobachtung nach ~20 h
8	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	klar, keine Niederschläge			
	9	klar			Niederschlag
	10	trüb	Niederschlag		
9	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	klar, keine Niederschläge,			
	8, 9, 10	trüb	Niederschlag		
10	1	klar, keine Niederschläge			
	2	klar		Niederschlag	
	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10	trüb	Niederschlag		

4.2.5 Zusammenfassung der Reihe zur Stabilisierung von Calciumphosphat-Nanopartikeln in NaCl-Lösung mit Modell-Proteinen

Die Ergebnisse der Versuchsreihen lassen sich schnell zusammenfassen. Die pH 10-Reihe mit Lysozym, BSA und Ubiquitin ergab keinerlei stabile Dispersionen. Auch die Erhöhung der Proteinkonzentration (2 bis 4 g L⁻¹) bei den höheren Calciumphosphat-Mengen brachten keinerlei stabile Dispersionen hervor.

4.2.6 Beladung der Nanopartikeloberfläche mit Proteinen

In diesem Abschnitt erfolgt eine Abschätzung der Nanopartikelbeladung mit den entsprechenden Proteinen. Neben den bekannten Werten und Größen der Partikel müssen hierzu einige Annahmen getroffen werden. Die Molmassen der Proteine sind bekannt (BSA ca. 200 kDa, Ubiquitin 8 kDa, Lysozym 14,6 kDa). Aus den Massen folgt ein ungefährender Radius der Proteine (BSA 15 nm, Ubiquitin 1,3 nm, Lysozym 2,5 kDa) unter der Annahme, dass sie als Kugel vorliegen. Die eingesetzten Volumina der Protein-Lösungen in mL entsprechen der Menge des Proteins in mg, wenn die

Proteinkonzentration 1 g L^{-1} ist. Somit kann direkt die Anzahl der Proteine berechnet werden. Die Größe der Nanopartikel ist auch bekannt, somit kann über die Oberfläche der Kugel und die Anzahl der Proteinmoleküle eine prozentuale Beladung der Oberfläche und eine Anzahl der Proteinmoleküle pro Nanopartikel berechnet werden. Jetzt ist noch zu berücksichtigen, dass die Oberfläche eines Nanopartikels durch die Kugeln (Proteine) nicht zu 100 % abgedeckt wird, da es sich nicht um einen Würfel handelt. Also muss hier die Fläche der Nanopartikel die beschichtet werden muss um 21,5 % reduziert werden. Liegt das Verhältnis zwischen Nanopartikeloberfläche und Proteinoberfläche bei Eins, so kann sich eine Monolage bilden. Hier gilt die Annahme, dass sich alle Proteinkugeln am Äquator lückenlos berühren, aber nicht überlagern. Bei Vernachlässigung dieser 21,5 % kann eine statistische Verteilung der Proteine auf der Oberfläche bestimmt werden. Auch wird angenommen, dass alle Proteinmoleküle sich an die Nanopartikel anlagern und keine Knäule bilden, welche auch nicht in der Lösung vorliegen. Die zugegebenen Calcium- und Phosphatlösungsmengen ergeben für 1 mL beider Lösungen 1,08 mg HAP (theoretisch)

Die in Kapitel 4.2 hergestellten Nanopartikel ergaben nur bei der Verwendung von Lysozym eine eindeutige Partikelgröße. Der Durchmesser lag bei 300 bis 500 nm, also ca. 400 nm, was einem Radius von 200 nm entspricht. Es wurde die Dichte des Hydroxylapatits ($3,16 \text{ g cm}^{-3}$) als Näherung angenommen. Aus dem Quotienten von Protein- und Nanopartikeloberfläche folgt eine 6,2 %ige Ausbildung einer Monolage auf der Oberfläche oder eine statistische Abdeckung der Oberfläche mit Proteinen von 7,9 %. Hier wird die Beladung nur an Lysozym beschrieben, da nur hiervon einigermaßen genaue Radien der Partikel ermittelt werden konnten. Die Beladung durch die anderen Proteine würde ebenfalls nicht zur Ausbildung einer Monolage führen (bei identisch angenommenem Radius). Die nötige Menge an BSA wäre 6 mal so hoch wie verwendet und bei Ubiquitin sogar 33 mal so hoch.

4.2.7 Zusammenfassung und Diskussion der Protein-Reihen zur Stabilisierung von Calciumphosphat Nanopartikeln in Wasser

Die in den Kapiteln 4.2.1 bis 4.2.3 durchgeführten Experimente belegen, dass sich die Stabilisierungserfolge, die mit den Polyaminosäuren erzielt wurden, nicht auf die Anwendung von Proteinen übertragen lassen. Es konnten so keine stabilen Partikeldispersionen von Calciumphosphat Nanopartikeln mit einer Proteinschicht synthetisiert werden. Mögliche Ursachen für diese Probleme können die verschiedenen

Ladungseigenschaften der in den Proteinen vorhandenen Aminosäuren der Primärstruktur sein. Die Polyamino-säuren haben eine einheitliche Ladung an der Oberfläche. Dies hat ein Protein üblicherweise nicht, somit wurde die Anlagerung erschwert.

Andererseits lagern sich nicht alle Proteinteile gleich gut an die Calciumphosphat-Oberfläche an, so dass eine geschlossene Schicht wie bei der sterischen Stabilisierung nicht ausgebildet werden kann. Abbildung 4.14 zeigt den Einfluss einer zu niedrigen Polymerkonzentration, wo sich mehrere Nanopartikelkerne über ein Polymer-Knäuel aneinanderlagern, ohne dass die Oberfläche des Kerns vom Polymer verschlossen wird. Steigt die Konzentration des Polymers über das ideale Maß hinaus, kommt es erst zur Verminderungsflockung (4.14. c). Bei weiter steigender Polymerkonzentration schließt sich nahtlos die Verminderungsstabilisierung an (Abb. 4.14 d). Dies führt zur Agglomeration der Partikel mit anschließender Sedimentation. Ein anderes Problem bei der Verwendung von Proteinen wird auch die sogenannte Überbrückungsflockung (Abbildung 4.14 a) sein. Denn es spricht nichts dagegen, dass sich an ein verhältnismäßig großes Protein mehrere kleine Nanopartikel-Keime anlagern können und sich dann zu größeren Agglomeraten ausbilden, bevor die Proteinschicht ein weiteres Wachstum unterbinden kann. Obwohl in einigen REM-Bildern Calciumphosphat-Protein-Nanopartikel sichtbar waren, ist diese Methode nicht geeignet, da nur eine gute Ausbeute zwischen eingesetzten Nanopartikeln und dem Protein weitere Versuche interessant machen würde. An dieser Stelle wäre bei der Methode jedoch eine Reinigungsprozedur wie Zentrifugieren und anschließendes Waschen der Niederschläge nötig.

Eine alternative Möglichkeit wäre das Filtrieren der Dispersion. Hier würden die Agglomerate entfernt werden, jedoch mit ihnen auch ein sehr großer Teil des eingesetzten Proteins, welches potentiell immer die teuerste Komponente eines solchen Versuches ist. Dies würde bei einer Anwendung bedeuten, dass ein Großteil der teuren Komponenten (Medikament, Proteine o.ä.) ohne Nutzen entfernt würde, was eine Anwendung zum jetzigen Zeitpunkt sehr unrealistisch macht. Daher musste die Prozedur modifiziert werden.

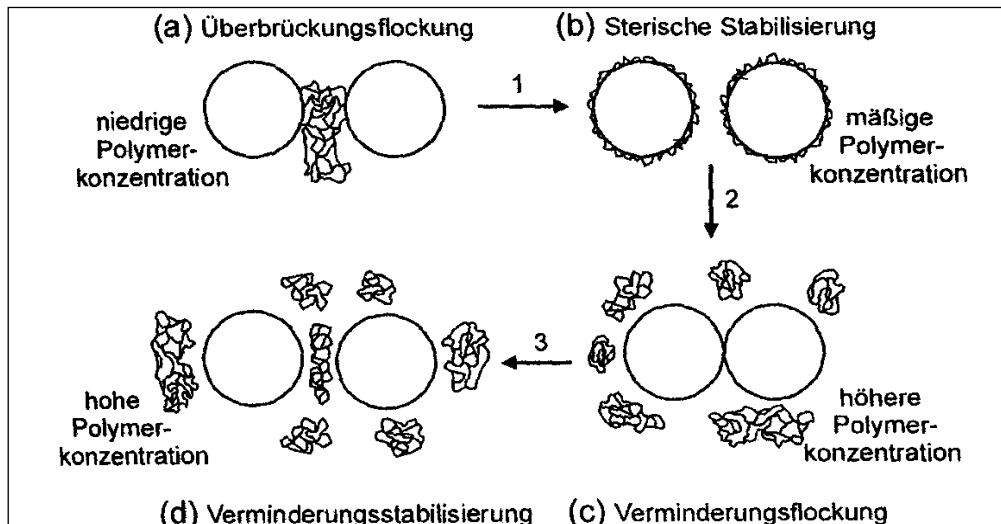


Abbildung 4.14 - Darstellung der Beschichtungstypen von kleinen Partikeln mit einer stabilisierenden Komponente

Die Versuche in Kapitel 4.2.4 hatten die Verwendung von NaCl in der Herstellungsprozedur, da dies eine Ladungsveränderung bewirken sollte. Die Idee hinter der Verwendung von NaCl war einerseits, die Fällung von Calciumphosphat zu verlangsamen, was den Proteinen eine längere Zeit verschafft hätte, die Kristallisationskeime zu umhüllen. Zum anderen sollten die Ionen des NaCl die Ladungsbereiche der Proteine weniger unterschiedlich laden, so dass größere Bereiche des Proteins eine ähnliche Ladung aufweisen. Dies sollte eine bessere Anlagerung zur Folge haben, da das Protein dann ladungstechnisch der Polyaminosäure ähnlicher sein würde. Der erhoffte Erfolg durch diesen Effekt, die Stabilisierung der Nanopartikel zu ermöglichen, blieb allerdings aus.

Daher wurde eine völlig andere Idee ins Reaktionsgeschehen gebracht – und zwar eine so genannte „Linker“-Verbindung, die sich einerseits gut an den Calciumphosphatkern anlagert, die Dispersion des Partikels also aufrecht erhält, und andererseits gleichzeitig die Anlagerung des Proteins an den Linker ermöglicht, so dass der Linker eine Brücke zwischen Nanopartikel und Protein bildet. Doch dieses Lipid sollte nicht länger als 2-3 nm sein und somit eine wesentlich kleinere sterische Hinderung aufweisen als ein Protein. Hierzu wurde ein sogenanntes Tetraetherlipid verwendet. Diese noch nicht gut charakterisierte Komponente wird vor der Verwendung als Linker in Kapitel 4.3 ausführlich charakterisiert und in Kapitel 4.4 bis 4.10 als Linker verwendet.

4.3 Charakterisierung der Tetraetherlipid-Fraktion

Da die Übertragung der Ergebnisse der Experimente von den Polyelektrolyten auf die Proteine fehlschlug, wurde eine alternative Stabilisierungssubstanz ausgewählt, ein Tetraetherlipid. Da dessen Zusammensetzung, Reinheit und Struktur nicht genau bekannt waren, wurden einige Untersuchungen des Glyceroldialkylnonitoltetraethers (GDNT) durchgeführt: MS, NMR, IR.

4.3.1 NMR-Untersuchung

Der erste Schritt bei der Verwendung des Tetraetherlipides war eine Charakterisierung des Lipides. Zu Beginn lag nur eine vermutete Struktur des Lipides vor (Abbildung 4.15). Hierzu wurden 300 MHz, 400 MHz und 700 MHz Spektren des Typs ^1H -, ^{13}C - und DEPT-135-Spektren und 2D- ^1H - ^{13}C -Spektren aufgenommen. Bei allen Spektren wurde das Lipid in CDCl_3 gelöst. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer von *BioChemDraw*^[98] durchgeführten ppm-Berechnung über die vermutete Struktur und einer Veröffentlichung von *Bode et al.*^[99]

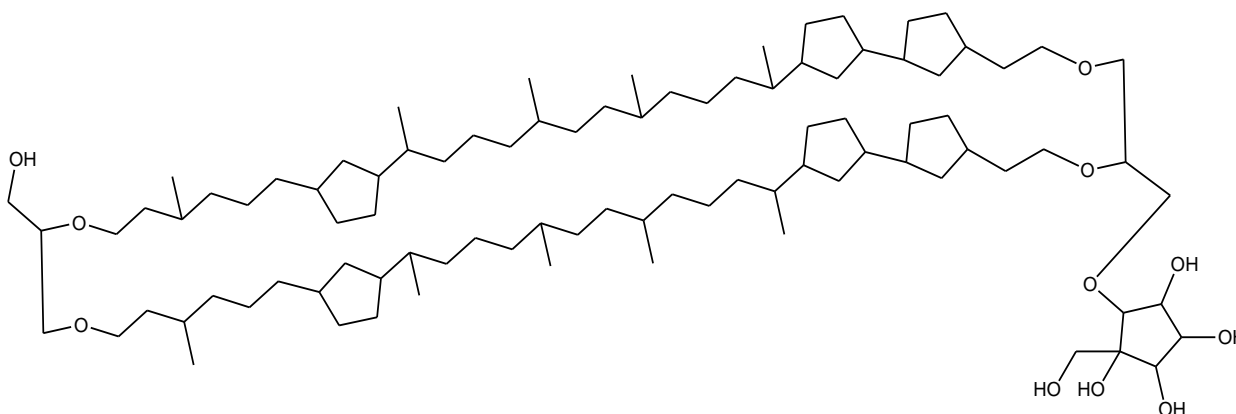


Abbildung 4.15 - GDNT-Struktur

4.3.1.1 ^1H -Kernresonanz-Spektren

Das ^1H -Spektrum von Abbildung 4.16 zeigt das Ergebnis der im Arbeitskreis von Prof. Bayer in der Universität Duisburg-Essen durchgeführten NMR-Messungen. Im Wesentlichen zeigt das Spektrum zwei sehr breite, nicht klar voneinander trennbare Peakgruppen (0,7-1,95 ppm und 3,42-4,34 ppm), ein Singulett bei 2,2 ppm und zwei Triplets (2,6 und 2,75 ppm). Das ^1H -Spektrum zeigt eine starke Ähnlichkeit zu ^1H -Spektren von *Bode et al.*, *Lo et al.* und *Mirghani et al.*^[99-101].

4 Ergebnisse und Diskussion

4.3 Charakterisierung der Tetraetherlipid-Fraktion

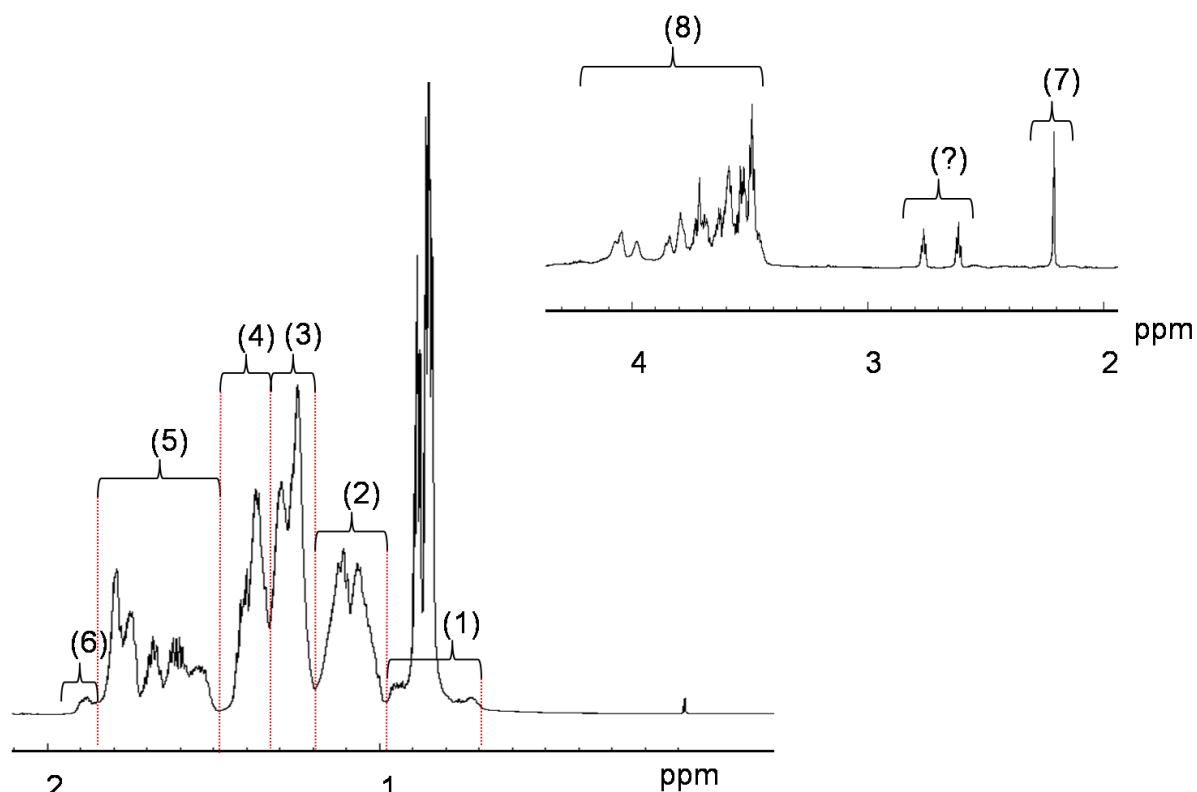


Abbildung 4.16 - 700 MHz- ^1H NMR-Spektrum des Tetraetherlipids (Bereich 0 - 2,1 und 2 - 4,5 ppm)

Vorab sei erwähnt, dass bei der Auswertung in den meisten Fällen einem Proton oder einer Gruppe von Protonen oftmals kein bestimmtes Signal zugeordnet werden konnte. Die Signale sind sehr breit und zeigen kaum noch Multiplizitäten. Sie überlagern sich teilweise stark, was die Auswertung sehr erschwert. Die runden Klammern oberhalb einer Signalgruppe (Abbildung 4.16) sollen die Zuordnung erleichtern und die Signalketten in Einheiten unterteilen. Im Großen und Ganzen sind die Signalketten der gefundenen ppm-Werte der Protonen dort, wo sie berechnet bzw. erwartet wurden. Im Folgenden werden jetzt anhand einer Tabelle die genauen Signalanfänge und -Enden mit der Literatur verglichen und mehrere kleine Ausschnitte einzeln betrachtet. In Tabelle 12 sind die dem NMR-Spektrum entnommenen Daten, denen die von *ChemBioDraw*^[98] berechnet wurden, gegenübergestellt. Zusätzlich tauchen dort auch die Gruppentypen der Protonen auf. Leider gab es in keiner der verwendeten Literaturstellen detaillierte Auswertungen der Protonensignale. Es wurden nur ^1H -Spektren veröffentlicht, aus denen auf Grund einer niedrigen Auflösung in Form einer Grafik maximal Werte von 1,5 oder 1,75 ppm abgelesen werden können. Eine genauere Zuordnung ist über die Veröffentlichungen von *Bode et al.*^[99] und *Lo et al.*^[100] und

4 Ergebnisse und Diskussion

4.3 Charakterisierung der Tetraetherlipid-Fraktion

andere Veröffentlichungen nicht möglich, daher dient *ChemBioDraw*^[98] ausschließlich als Auswertungs- und Vergleichsquelle für das ¹H-Spektrum.

Tabelle 12 - Chemische Verschiebungen der Protonen verglichen zwischen *ChemBioDraw*^[98] und den im Spektrum ermittelten Werten

Chemische Verschiebungen der Protonen verglichen zwischen den von <i>ChemBioDraw</i> ^[98] berechneten Werten und den im Spektrum ermittelten Werten				
ppm		Gruppe	<i>ChemBioDraw</i> ^[98]	
von	bis		ppm	
0,7	0,98	Methyl-Protonen	0,96	(1)
0,98	1,34	Methylen-Protonen der Ketten	1,13 - 1,24	(2)
1,34	1,48	Methylen-Protonen der Ketten und des 5er-Rings	1,35 - 1,38	(3)
1,48	1,58	Methin-Protonen an den Ringen, Methylen-Protonen am Ether	1,42 - 1,54	(4)
1,58	1,66	Methin-Protonen an die eine Methyl-Gruppe und zwei benachbarte Methylen-Gruppen im 5er-Ring angelagert sind	1,60 - 1,65	(5)
1,66	1,73		1,60 - 1,65	(5)
1,73	1,78		1,60 - 1,65	(5)
1,78	1,86		1,60 - 1,65	(5)
1,86	1,94	einzelne Methylen-Gruppe im 5er-Ring	1,88	(6)
2,20	2,22	einzelne Methylen-Gruppe im 5er-Ring	2,13	(7)
2,60	2,63	einzelnes Triplett		k.A.
2,75	2,78	einzelnes Triplett		k.A.
3,42	4,34	Protonen an den Kohlenstoffen mit einer OH-Gruppe in direkter Nachbarschaft zu den Etherbrücken	3,25 - 3,77	(8)

4 Ergebnisse und Diskussion

4.3 Charakterisierung der Tetraetherlipid-Fraktion

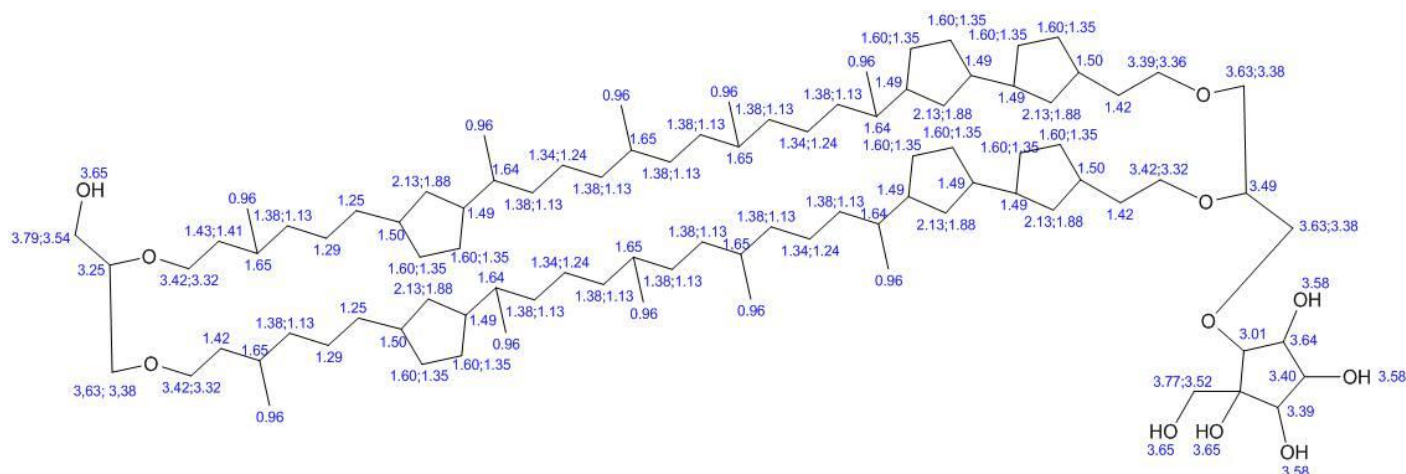


Abbildung 4.17 - Struktur des Lipides mit den von *ChemBioDraw*^[98] berechneten chemischen Verschiebungen im NMR-Protonen-Spektrum

Abbildung 4.17 zeigt die gesamte Masse an ppm-Werten, die *ChemBioDraw*^[98] als Vergleich vorschlägt. Diese Darstellung ist jedoch aufgrund der vielen Werte sehr unübersichtlich. Daher sollten weitere Abbildungen diese komplexe Datenmenge durch kleine Abschnitte übersichtlicher aufschlüsseln. Sie zeigen die in Klammern stehenden Zahlen der Tabelle, die auch im ¹H-Spektrum symbolisch für bestimmte Gruppen stehen. So können die meisten Gruppen übersichtlich einem ppm-Wert zugeordnet werden.

Die nachfolgende Abbildung 4.18 zeigt die im ¹H-Spektrum und in Tabelle 10 als Signal (1) gekennzeichneten Protonen. Es sind ausschließlich die Protonen der CH₃-Gruppen des Rückgrates. *ChemBioDraw*^[98] berechnet für die Struktur nur ein Signal, in dem gemessenen Spektrum treten jedoch zwei Signalgruppen (zwischen 0,9 und 0,8 ppm) auf. Die Dublett-Struktur der Signale ist sehr deutlich sichtbar. Diese sind zu erwarten, da jedes der drei Protonen der CH₃-Gruppe mit dem benachbarten Proton der CH-Gruppe koppeln und so das Dublett entsteht. Diese lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: eine Methyl-Gruppe hat nach der Methin-Gruppe auf beiden Seiten Methylen-Gruppen als Nachbarn, und die andere hat an dieser Stelle nicht zwei Methylen-Gruppen sondern einen 5er-Ring und eine Methylen-Gruppe. Des Weiteren lassen sich die Dubletts auch über ihre Nähe zur Etherbrücke unterteilen, was ebenfalls für alle Methylen-Gruppen unterschiedlich stark in die chemische Verschiebung einfließt.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.3 Charakterisierung der Tetraetherlipid-Fraktion

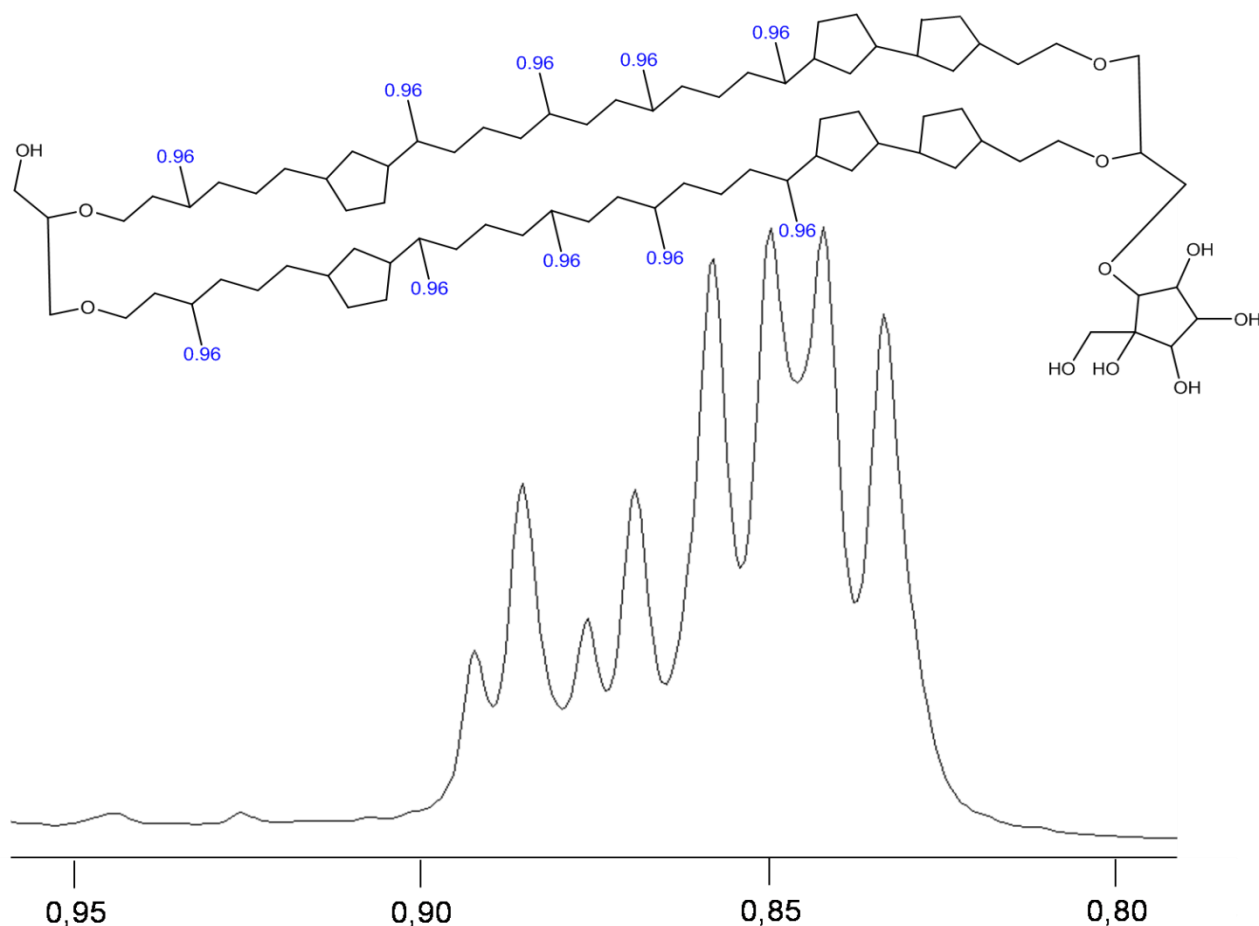


Abbildung 4.18 - GDNT-Struktur und 400 MHz- ^1H -Ausschnitt des 0,7-0,95 ppm-Bereiches

In den folgenden Abbildungen 4.19 werden mehrere sich überlagernde Gruppen dargestellt. Die einzelnen Signale können zwar laut *ChemBioDraw*^[98] klar differenziert werden, jedoch überlappen die Signale im gemessenen Spektrum sehr stark. Daher können die Veränderungen der chemischen Verschiebungen durch die Umgebung nicht exakt zugeordnet werden. Somit ist auch eine exakte Protonen-Signal Zuordnung nicht möglich. Im NMR-Spektren-Auszug gibt es zunächst das Signal (2), rot dargestellt. Es wird formell als sehr breiter Bereich (von 1,0-1,33 ppm) zugeordnet. In diesem Bereich liegen die Signale aller CH_2 -Gruppen im Rückgrat der Struktur. Die ppm-Werte der Hauptsignale sollten laut *BioChemDraw*^[98] bei 1,13, 1,24, 1,25 und 1,29 ppm liegen. Dies stimmt mit den recht breiten Signalen der Messung sehr gut überein. Problematisch ist hierbei die Multiplett-Ausbildung, denn jedes CH_2 -Proton hat mehrere Kopplungspartner. Somit entsteht eine große Menge an sich überlagernden Signalen. Treten im Rückgrat Variationen wie beispielsweise eine höhere oder niedrigere Anzahl an 5er-Ringen in der Struktur auf, so kommt es auch zu einer Verschiebung zu

4 Ergebnisse und Diskussion

4.3 Charakterisierung der Tetraetherlipid-Fraktion

höherem oder niedrigeren ppm-Werten. Zusätzlich liegen manche CH_2 -Gruppen auch noch näher an den Etherbrücken. Etwas verwunderlich ist das starke Signal bei 1,05 ppm, denn kein ppm-Wert in diesem Bereich wurde berechnet.

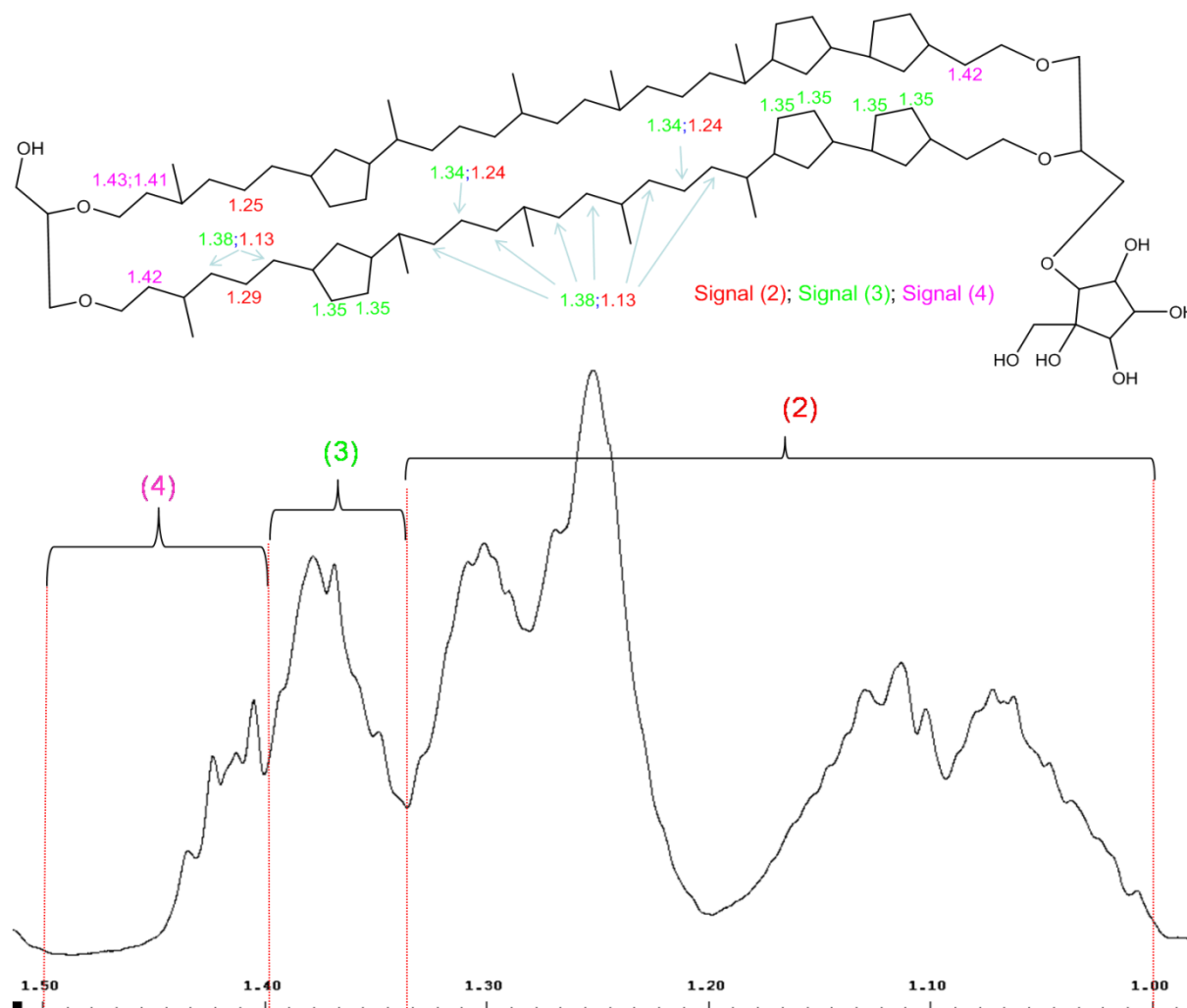


Abbildung 4.19 - GDNT-Struktur und 700 MHz- ^1H -Ausschnitt des 1,0-1,5 ppm-Bereiches

Signal (3) (grün dargestellt) befasst sich mit einem weiteren Signalbereich der CH_2 -Gruppen des Rückgrates. Sie werden bei 1,34 ppm und 1,38 ppm erwartet. Des Weiteren zeigen sich hier auch die Signale der zwei benachbarten CH_2 -Gruppen der 5er-Ringe. Deren ppm-Werte liegen bei 1,35 ppm, also zwischen denen der CH_2 -Gruppen im Rückgrat. Eine genauere Aufschlüsselung ist nicht möglich, da im Spektrum die 1,34- und 1,35-ppm-Werte nicht unterscheidbar sind. Eine entscheidende Rolle für die chemische Verschiebung resultiert hier aus den verschiedenen Umgebungen der CH_2 -Gruppen und 5er-Ringen. Trotz einer stark ausgeprägten Signalverarbeitung stimmen die berechneten und gemessenen Ergebnisse gut überein.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.3 Charakterisierung der Tetraetherlipid-Fraktion

Signal (4) (pink dargestellt) fasst die Protonen der CH₂-Gruppen, in β -Position zur Ethergruppe des Lipides zusammen. Die berechneten ppm-Werte von $\sim 1,42$ ppm stimmen ebenfalls genau mit den berechneten Signalwerten überein.

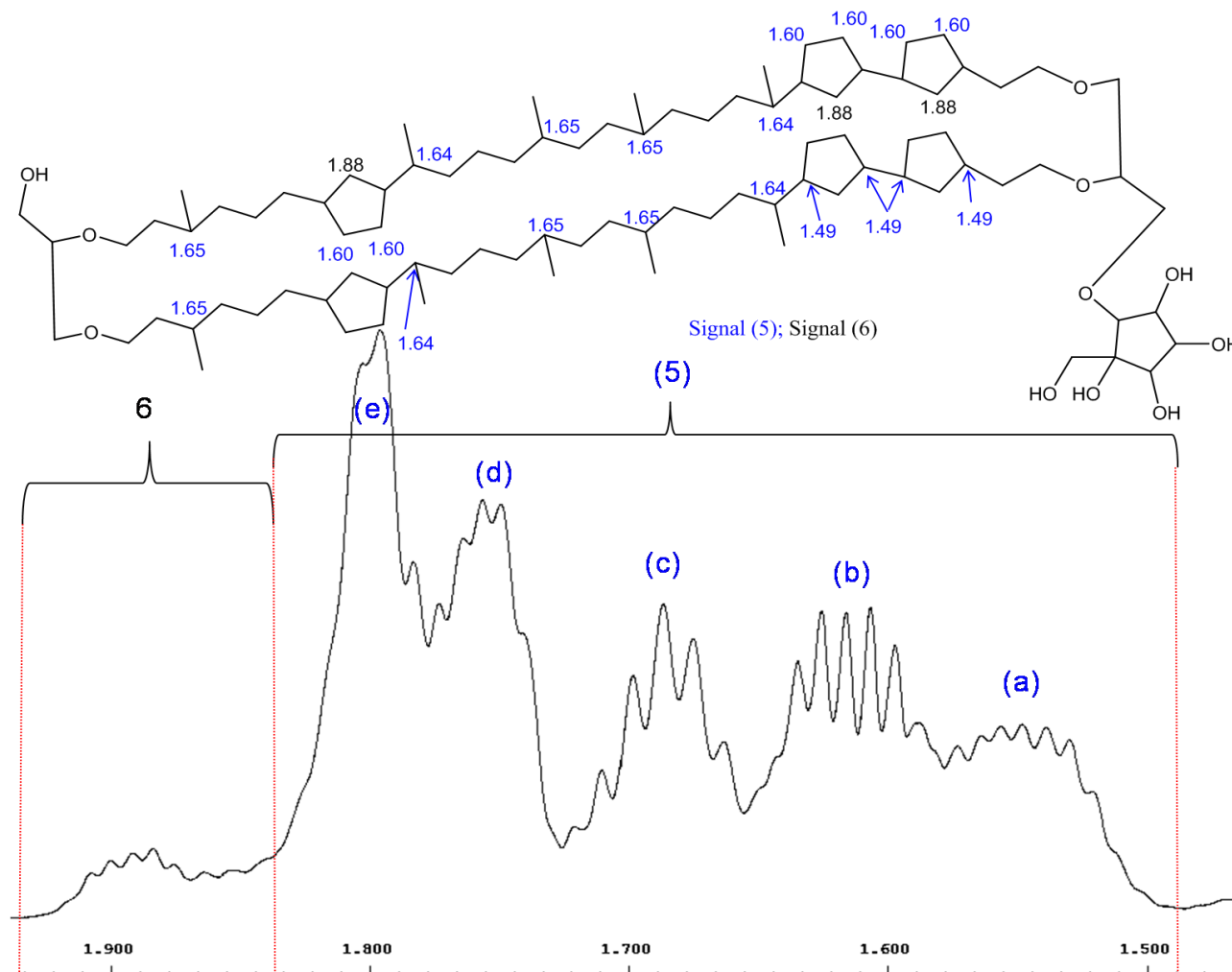


Abbildung 4.20 - GDNT-Struktur und 700 MHz-¹H-Ausschnitt des $\sim 1,5$ - $1,9$ ppm Bereiches

In Abbildung 4.20 wird eine sehr breite Signalkette zusammengefasst. Signal (5) (blau dargestellt), fasst grob betrachtet fünf Signale zusammen, deren Maxima bei 1,54 (a) / 1,61 (b) / 1,68 (c) / 1,75 (d) und 1,79 (e) ppm liegen. Dieser Signalkette konnten die berechneten ppm-Werte der beiden CH-Gruppen der 5er-Ringe zugeordnet werden, welche 1,49 ppm betragen sollten. Dies würde zu Signal 5 (a) passen. Signal 5 (b) können die zwei benachbarten CH₂-Gruppen des 5er-Ringes zugeordnet werden, deren ppm-Werte für 1,60 ppm berechnet wurden. Diese Signale verursachen zwei Signale (bei 1,35 und 1,6 ppm), da sie einerseits miteinander koppeln und andererseits mit dem Proton der CH-Gruppe des 5er-Ringes koppeln. Das Signal 5 (c) kann den CH-

Gruppen des Rückgrates, an denen sich die CH₃-Gruppen befinden, berechnet für 1,64-1,65 ppm, zugeordnet werden. Problematisch ist die Zuordnung der Signale 5 (d) und (e); sie stellen vermutlich Protonen aus dem Bereich von Signal 5 (a-c) da, die leicht tieffeldverschoben sind. Weshalb ist unklar. Wiederum muss hier betont werden, dass die Anzahl der 5er-Ringe in der Struktur und damit auch die Struktur des Rückgrates variieren kann. Signal (6) (schwarz dargestellt) beinhaltet die einzelne CH₂-Gruppe an der „Spitze“ des 5er-Ringes. Berechnet wurde ein Wert von 1,88 ppm, dieser stimmt wieder sehr gut mit der Messung überein. Auch das wegen der sterischen Ausrichtung der beiden Protonen gebildete zweite Signal bei 2,13 ppm (Abbildung 4.21) ist vorhanden. Der starke Unterschied der chemischen Verschiebung ist auf der einen Seite durch den geringen Einfluss der β-Methylen-Gruppen und auf der anderen Seite durch sterische Hinderung auf Grund der Konformation des 5er-Ringes hoch. Auch kommt zum Tragen, dass eines der Protonen an der Spitze des Ringes in cis- und das andere in trans-Ausrichtung zum Ring steht. Beides beeinflusst die chemische Verschiebung stark. Allerdings sind die berechneten Zahlenwerte der chemischen Verschiebung von *ChemBioDraw*^[98] hier recht ungenau, denn neben den Inkrementwerten ist auch ein Korrektur-Faktor von 0,57 ppm von unklarer Herkunft angegeben.

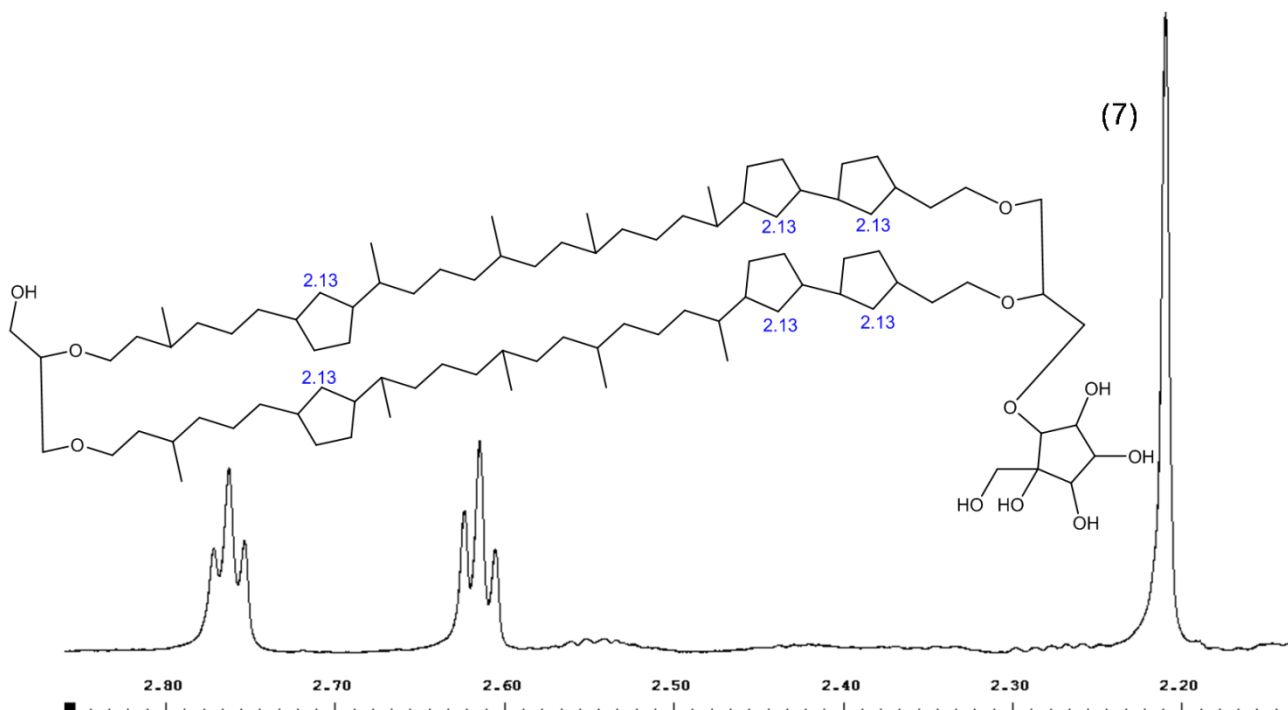


Abbildung 4.21 - GDNT-Struktur und 700 MHz- ^1H -Ausschnitt des 2,2-2,8 ppm Bereiches

In dieser Abbildung 4.21 wird das schwarz dargestellte Signal (7) betrachtet. Der ppm-Wert wurde mit 2,13 ppm berechnet und damit liegt er gut im Rahmen, denn gemessen wurde 2,1 ppm. Interessanterweise liegen in dieser Abbildung bei 2,61 und 2,76 ppm zwei sehr klare Triplets, aber dort sollten keine sein. Das später folgende 2D- ^1H - ^{13}C -Spektrum konnte zumindest zeigen, mit welchem Kohlenstoff die beiden Triplets koppeln. Eine Ursache für die Signale ist hier auch wieder leicht auf eine besondere Variation zu schieben, aber eigentlich kann es sich auch um eine Verunreinigung handeln, denn für diesen Bereich wurden über *ChemBioDraw*^[98] keine Signale berechnet. Die Variationen der Struktur müssten sich auf Signale zwischen 0,75-2,2 ppm und über 3 ppm erstrecken. Des Weiteren ist ein so klares Triplett nicht in der Struktur zu erwarten. Abbildung 4.24 gibt weitere Auskünfte zu den beiden Triplets.

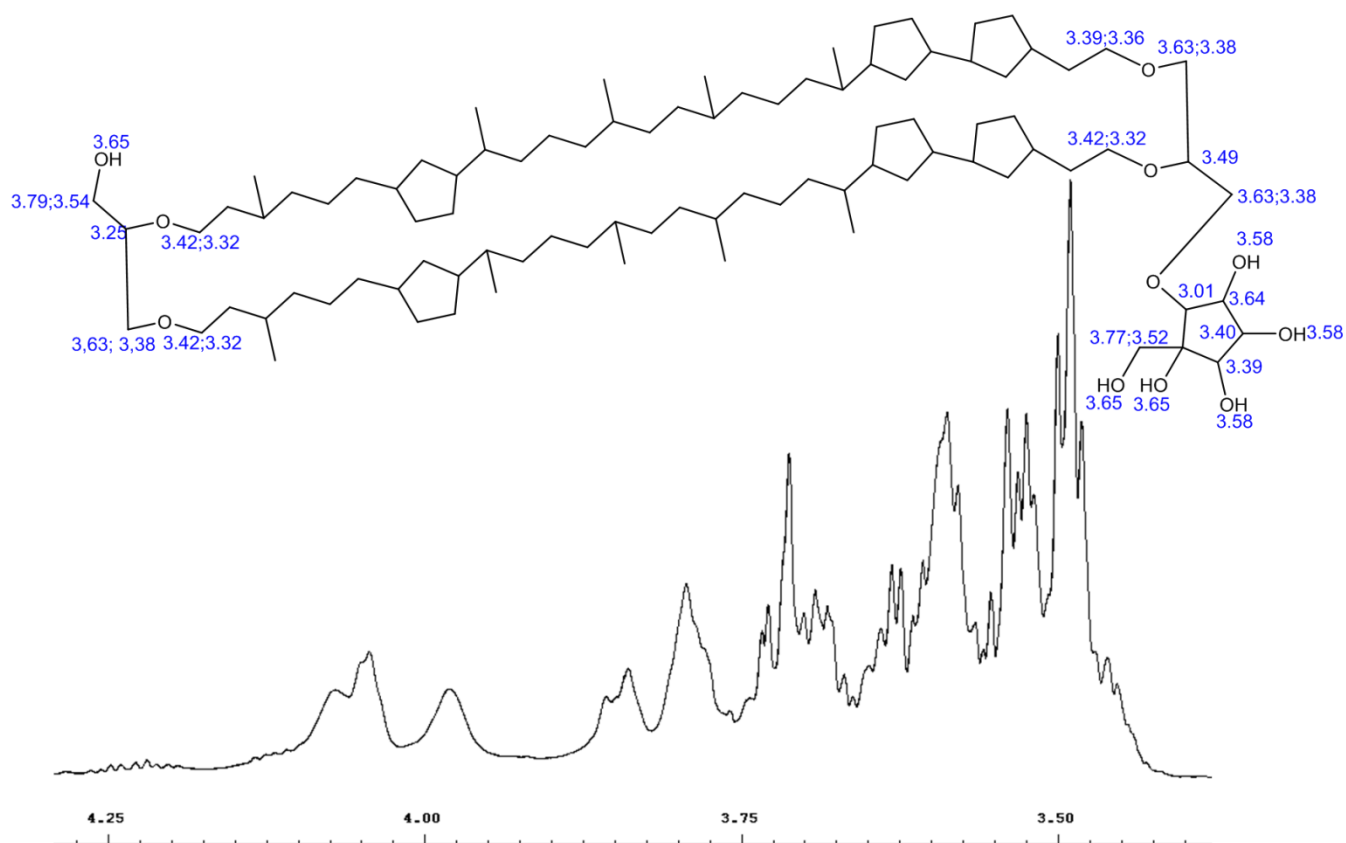


Abbildung 4.22 - GDNT-Struktur und 700 MHz- ^1H -Ausschnitt des 3,1-4,25 ppm Bereiches

Hier in Abbildung 4.22 sind die Protonen zusammengefasst, die im Tieffeld des Spektrums liegen. Es handelt sich um die Protonen, die in α -Position einer Etherbrücke oder einer OH-Gruppe sitzen. Insgesamt liegen die gemessenen Werte über den berechneten. Dies passt auch besser zu den Literaturwerten, denn *Lo et al.*^[100] zeigen

4 Ergebnisse und Diskussion

4.3 Charakterisierung der Tetraetherlipid-Fraktion

neben den anderen Signalen auch hier genau die gefundenen Abweichungen von den Berechnungen. Auch der ppm-Signal-Bereich für die Sauerstoffumgebung reicht ebenfalls bis über 4 ppm. *Sugai et al.*^[102] veröffentlichten Untersuchungen zu einem acetylierten Calditol (Abbildung 4.23 links), allerdings ohne die Anbindung eines Lipides. Die Struktur ist sehr ähnlich zum Calditol, jedoch fehlt der Einfluss der Ethergruppen, wie es beim verwendeten Lipid der Fall ist (Abbildung 4.23 rechts). R' und R'' sollen das Rückgrat des Lipides darstellen. *Sugai et al.*^[102] fanden ebenfalls ppm-Werte im Protonenspektrum von über 4 ppm.

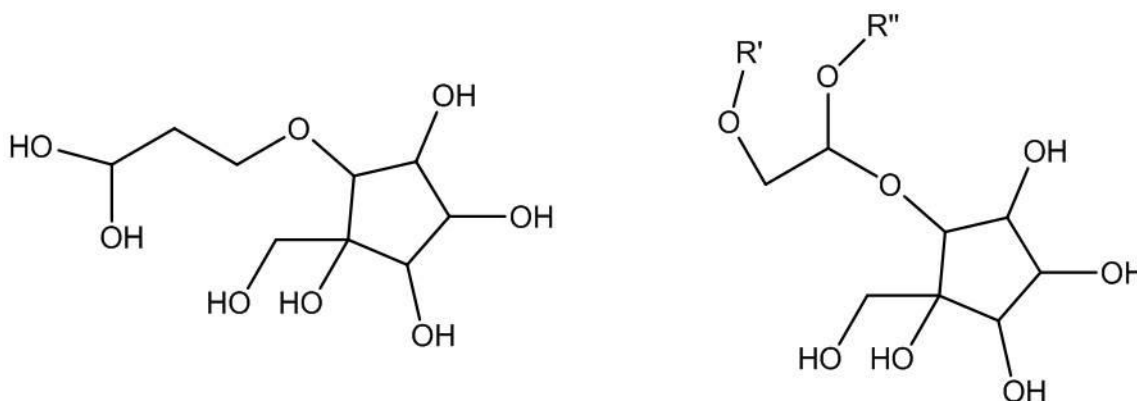


Abbildung 4.23 - Struktur des acetylierten Calditols ohne Lipid^[102] und des unacetylierten Calditols mit einer Etherbrücke

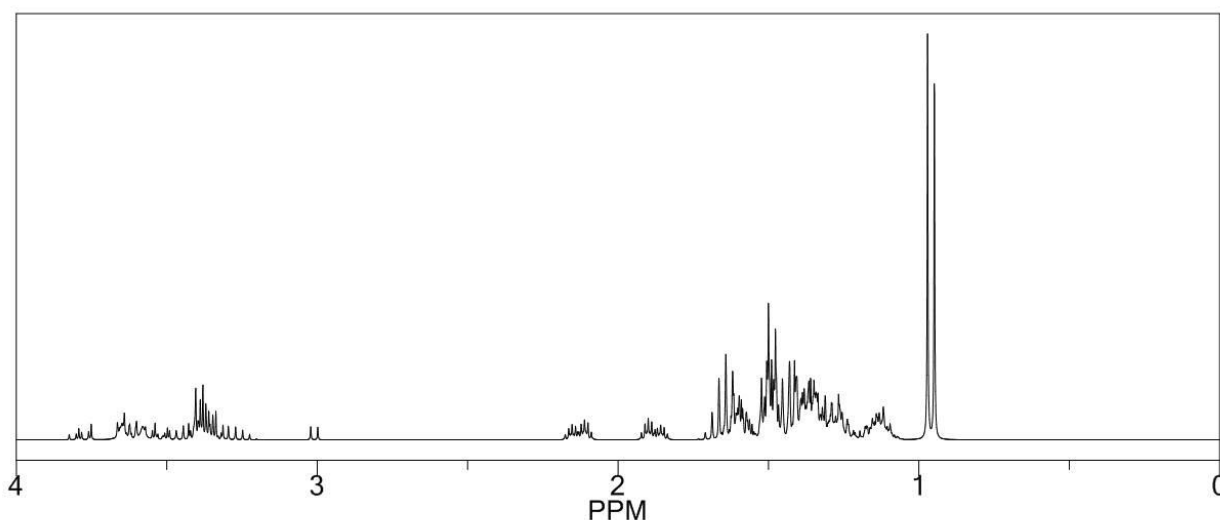


Abbildung 4.24 - ¹H-Spektrum berechnet von *ChemBioDraw*^[98]

Abschließend wird in Abbildung 4.24 das Protonenspektrum gezeigt, welches von *ChemBioDraw*^[98] berechnet wurde. Die Signale sind hier sehr klar aufgelöst. In den gemessenen Spektren überlagern sich die Signale viel stärker. Die chemischen

4 Ergebnisse und Diskussion

4.3 Charakterisierung der Tetraetherlipid-Fraktion

Verschiebungen im Bereich von 0,8 bis 1,75 ppm und ab 3 ppm sind zu den gemessenen Spektren sehr ähnlich. Das Hauptaugenmerk soll jedoch auf den zwei Signalen bei 1,88 und 2,13 ppm liegen. Wie in Abbildung 4.20 und 4.21 sind diese Signale der Spitze des 5er-Ringes zugeordnet. Jedoch ergaben die gemessenen Spektren bei 2,60 und 2,75 ppm zwei Signale, die bislang nicht genau zugeordnet werden können. Es ist möglich, dass der schon oben erwähnte Korrektur-Faktor von *ChemBioDraw*^[98] die chemische Verschiebung falsch berechnet und so die beiden Signale in einer realen Messung stärker tieffeldverschoben sind. Wie ebenfalls schon oben beschrieben, sind die beiden Signale aber an dieser Stelle nicht genau zu identifizieren. Die 2D-Spektren (Kapitel 4.3.1.5) können hier weitere Informationen liefern.

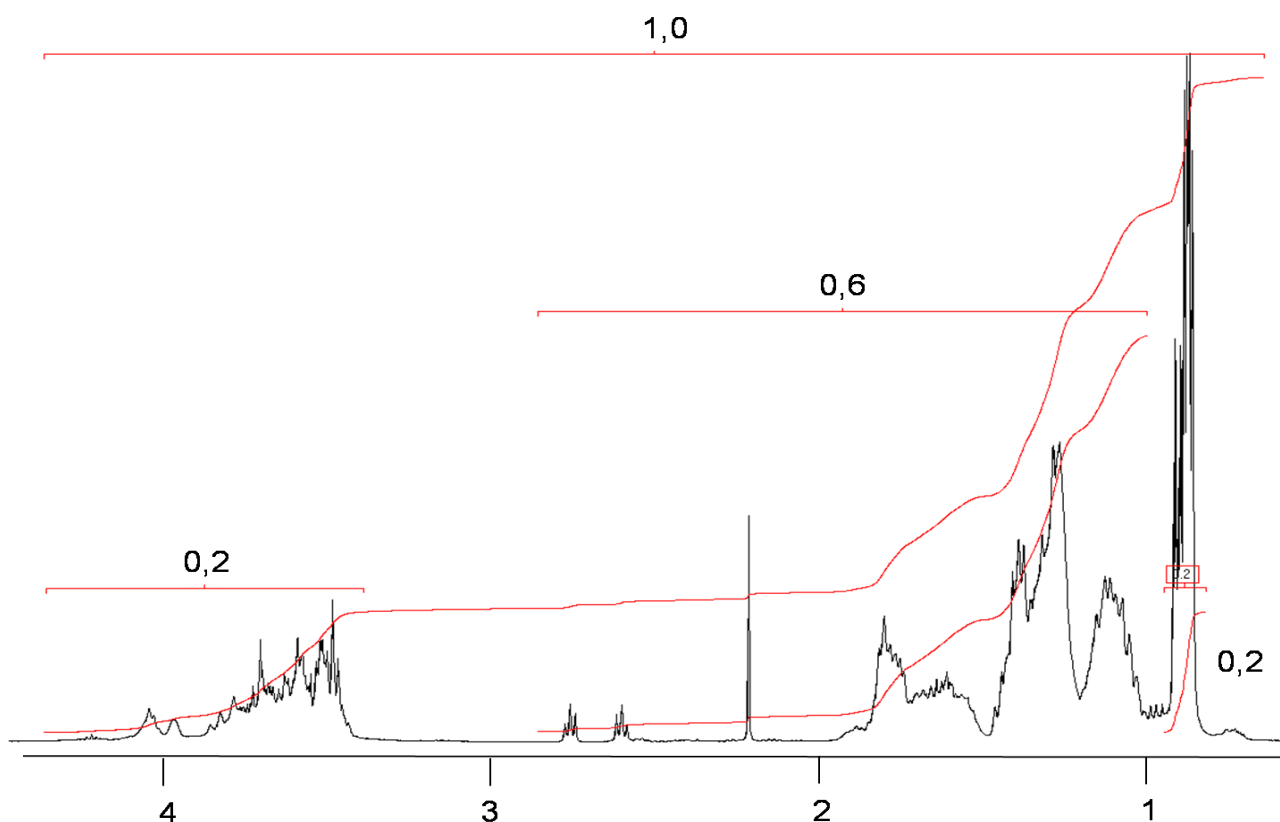


Abbildung 4.25 - 400 MHz-¹H-Spektrum mit den Flächenintegralen

In Abbildung 4.25 werden die Protonensignale des ¹H-Spektrums dargestellt. Das gesamte Spektrum hat die Fläche 100 % (in der Abbildung 1,0). Je 20 % der Protonen entfallen auf die Methylen-Gruppen und die direkte Umgebung der Etherbrücken bzw. OH-Gruppen (Abbildung 4.22). Die 10 CH₃-Gruppen des Rückgrades haben 30 Protonen und die Sauerstoffumgebung hat 31 Protonen, daher besitzen beide Signale im ¹H-Spektrum sehr ähnliche Peak-Flächen. Die 60 % müssen demnach ca. 90

Protonen sein. Die angenommene Struktur sollte also ca. 150 Protonen besitzen. Werden alle in Abbildung 4.17-4.22 dargestellten Atome addiert, kommt die Summenformel $C_{92}H_{170}O_{11}$ heraus. Die Fläche der Integrale ist durch das Überlappen der Signale stark verfälscht. Die Integral-Werte besitzen nur eine Nachkommastelle, was wiederum ebenfalls die Genauigkeit einschränkt. Werden die 170 Protonen als 100 % gesetzt kommen für 30 Protonen (CH_3) 17,64 %, für 31 (O-Umgebung) 18,23 % und für die restlichen 109 Protonen 64,12 % heraus. Wird nun genauso grob gerundet wie in Abbildung 4.25, so kommen ebenfalls 20 %, 20 % und 60 % heraus. Also kann zusammenfassend gesagt werden, dass die Integration zwar ungenau ist, aber doch im Wesentlichen zutrifft.

4.3.1.2 Zusammenfassung des Protonenspektrums

Die vielen Protonen des Lipides lassen sich nur in Bereiche einteilen. Eine exakte Zuordnung ist teilweise möglich, aber einige Signale bleiben ungeklärt. Alle Signale passen in die vorgesehenen Signalbereiche, mit Ausnahme der beiden Triplets zwischen 2-3 ppm. Hier kann aber nochmals *Lo et al.*^[100] zitiert werden, denn die Gruppe von Lo fand im Bereich zwischen 2 und 3 ppm drei einzelne Signale. Leider wurde nichts zu den Multiplizitäten geschrieben und ist den Grafiken auch nicht zu entnehmen. Zur weiteren konkreteren Aufklärung der Struktur sind weitere Spektren nötig, daher folgt jetzt die ^{13}C -Auswertung (Standard ^{13}C und DEPT-135-Spektrum). Ein Abgleich zwischen DEPT-135-Spektrum und 1H -Spektrum zeigt, an welchem Kohlenstoffatom wie viele Protonen hängen und ob diese mit den Zuordnungen im 1H Spektrum einhergehen. Dies folgt nach den ^{13}C -Kernresonanz-Spektrenauswertung.

4.3.1.3 ^{13}C -Kernresonanz-Spektren

Zu Beginn der ^{13}C -Spektren-Auswertung wurde ein zu erwartendes ppm-Profil erstellt. Dies wurde ermöglicht über die Verwendung von *BioChemDraw*^[98] zur Berechnung der ppm-Werte und die Nutzung von Veröffentlichungen von *Bode et al.*^[99] und *de Rosa et al.*^[103] Abbildung 4.23 zeigt die Kombination aus beiden Literaturstellen. Blaue Zahlen an den diversen Kohlenstoffen in den Strukturabbildungen zeigen die über *BioChemDraw*^[98] erfolgten Berechnungen der zu erwartenden chemischen Verschiebung und die schwarzen Buchstaben zeigen die von *Bode et al.* charakterisierten Kohlenstoffatome. In Kombination von ^{13}C -Spektrum und DEPT-135-Spektrum kann ermittelt werden, ob die angenommenen Werte auch mit entsprechenden Gruppen übereinstimmen. Die Struktur (Abbildung 4.26) sowie ^{13}C -

4 Ergebnisse und Diskussion

4.3 Charakterisierung der Tetraetherlipid-Fraktion

(Abbildung 4.27) und DEPT-135-Spektrum (Abbildung 4.28) sind zu unübersichtlich, so dass diese Spektren in kleinere Abschnitte zerlegt werden müssen. Im weiteren Identifikationsprozess wird auch eine ältere Veröffentlichung von *de Rosa et al.*^[103] zu Hilfe genommen. Sie untersuchten Lipidfraktionen mit verschiedenen Kopfgruppen und verschiedenen 5er-Ringkombinationen, daher konnten einige Signal-Werte zum Vergleich herangezogen werden.

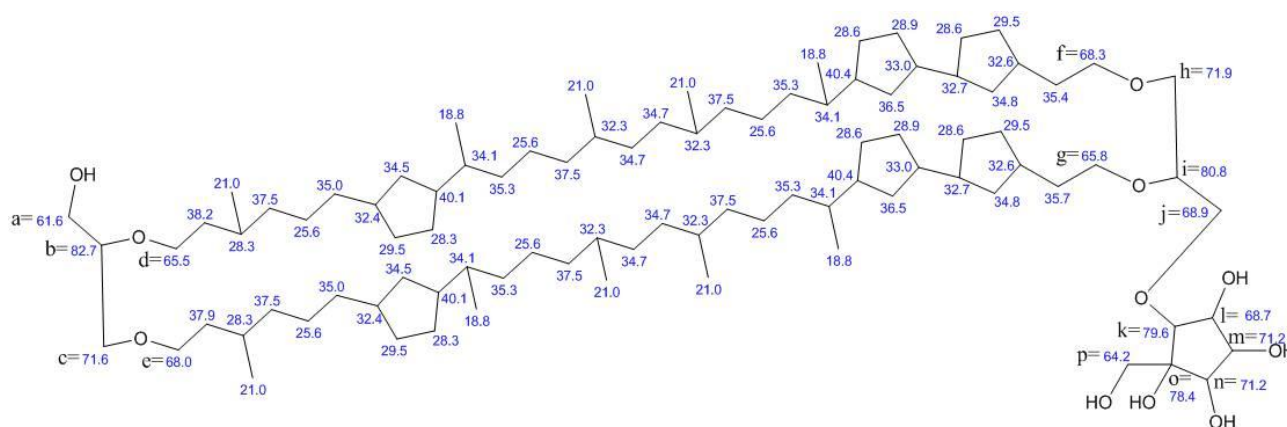


Abbildung 4.26 - Zu erwartende chemische Verschiebung^[98,99,103] des NMR-¹³C-Spektrums an der Struktur dargestellt

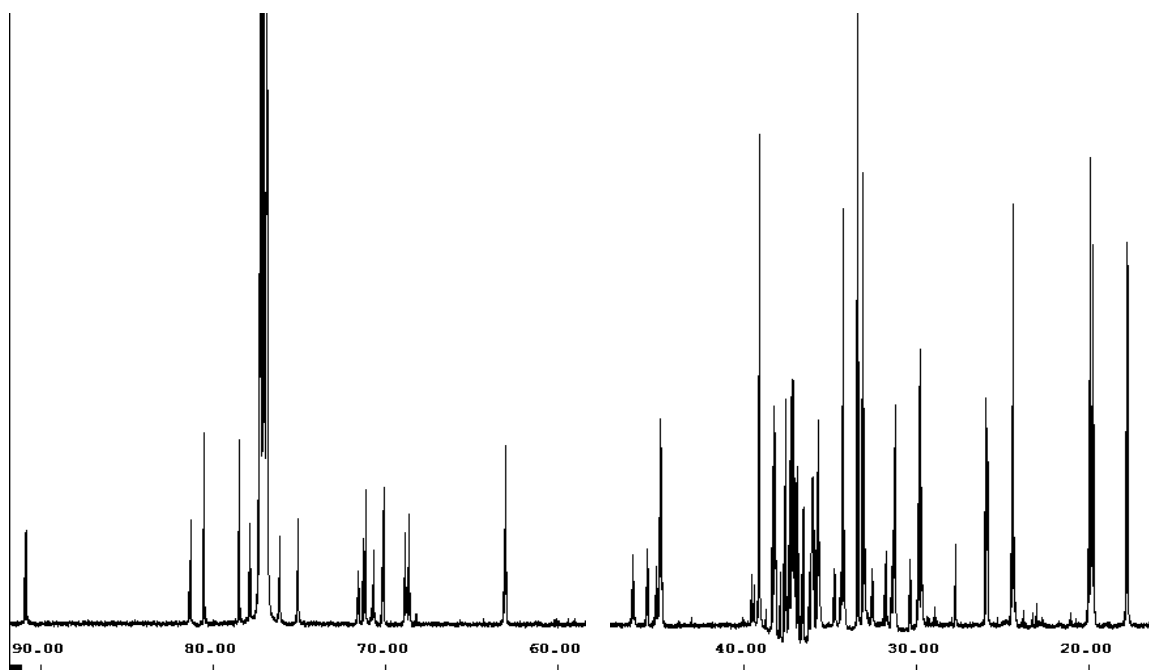


Abbildung 4.27 - Gemessenes 700 MHz-¹³C-Spektrum - ohne den signalfreien Bereich von 48-58 ppm

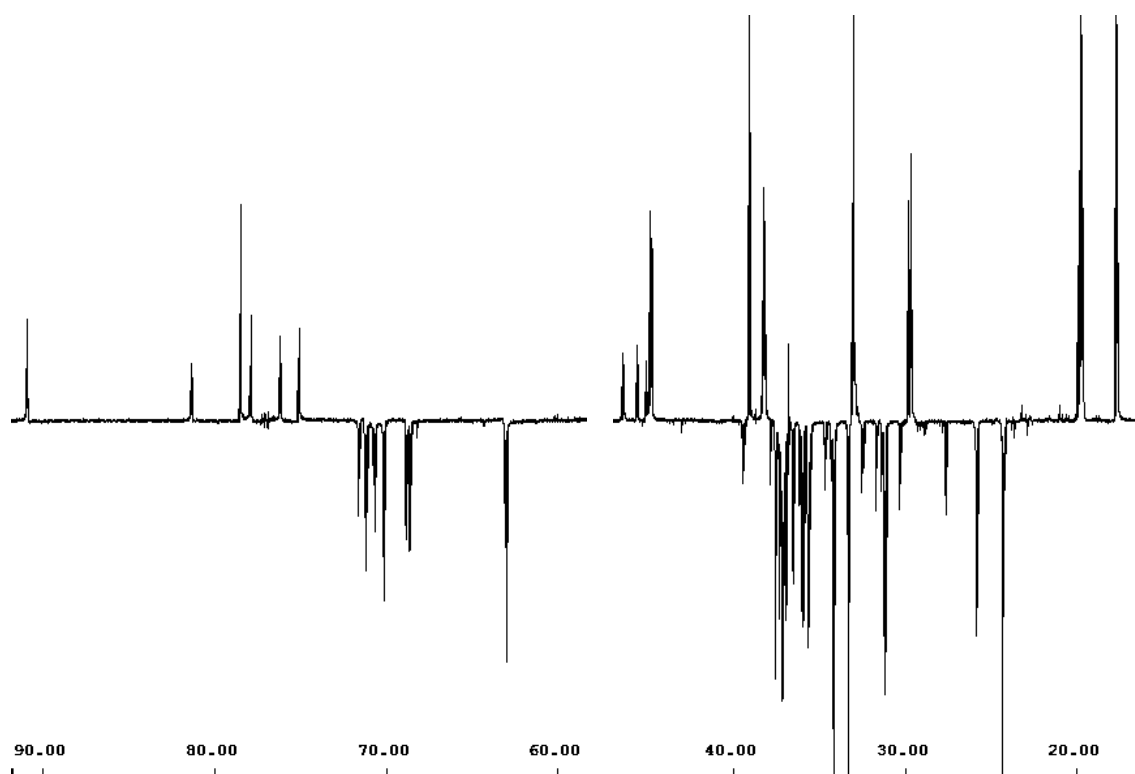


Abbildung 4.28 - Gemessenes 700 MHz-DEPT-135-Spektrum, ohne den signalfreien Bereich von 48-58 ppm

Bevor das ^{13}C -Spektrum aufgeschlüsselt und mit dem DEPT-135-Spektrum verglichen wird, folgt noch eine Tabelle, welche Literatur und Messwerte gegenüberstellt. Zusätzlich ist auch eingetragen, ob es sich in der Messung und Literaturstelle um eine CH- / CH_2 - / oder CH_3 -Gruppe handelt. Diese Daten können so direkt miteinander verglichen werden.

Tabelle 13 - Gegenüberstellung der chemischen Verschiebung von Mess- und Literaturwerten^[99, 100, 102, 103] im 700 MHz- ^{13}C -Spektrum

Gegenüberstellung der chemischen Verschiebung von Mess- und Literaturwerten im 700 MHz- ^{13}C -Spektrum						
Signal-intensität (Signal im Spektrum)	Messung		Zugeordnete Gruppe		ppm-Werte	
	ppm	Gruppe	Literatur ^[99, 100, 102, 103]	BioChem-Draw ^[98]	Literatur ^[99, 100, 102, 103]	BioChem-Draw ^[98]
mittel (1)	17,70	CH_3 -Gr.	CH_3 -Gr.	CH_3 -Gr.	18	18,8
groß (1)	17,74	CH_3 -Gr.	CH_3 -Gr.	CH_3 -Gr.	18	18,8
groß (1)	17,79	CH_3 -Gr.	CH_3 -Gr.	CH_3 -Gr.	18	18,8
mittel (1)	19,70	CH_3 -Gr.	CH_3 -Gr.	CH_3 -Gr.	18	18,8
groß (1)	19,77	CH_3 -Gr.	CH_3 -Gr.	CH_3 -Gr.	18	18,8

4 Ergebnisse und Diskussion

4.3 Charakterisierung der Tetraetherlipid-Fraktion

Signal- intensität (Signal im Spektrum)	Messung		Zugeordnete Gruppe		ppm-Werte	
	ppm	Gruppe	<i>Literatur</i> [99,100,102,103]	<i>BioChem- Draw</i> ^[98]	<i>Literatur</i> [99,100,102,103]	<i>BioChem- Draw</i> ^[98]
groß (1)	19,89	CH ₃ -Gr.	CH ₃ -Gr.	CH ₃ -Gr.	18	18,8
mittel (2)	20,00	CH ₃ -Gr.	CH ₃ -Gr.	CH ₃ -Gr.	20	21
groß (3)	24,40	CH ₂ -Gr.	CH ₂ -Gr.		24,5	25,6
mittel (3)	25,86	CH ₂ -Gr.	CH ₂ -Gr.		26	25,6
mittel (3)	25,88	CH ₂ -Gr.	CH ₂ -Gr.		26	25,6
mittel (3)	25,92	CH ₂ -Gr.	CH ₂ -Gr.		26	25,6
mittel (3)	25,95	CH ₂ -Gr.	CH ₂ -Gr.		26	25,6
mittel (5)	27,70	CH ₂ -Gr.				28,3
klein (4)	29,68	CH-Gr.	CH-Gr.	CH-Gr.	30	28,3
mittel (4)	29,75	CH-Gr.	CH-Gr.	CH-Gr.	30	28,3
mittel (4)	29,86	CH-Gr.	CH-Gr.	CH-Gr.	30	28,3
klein (6)	30,30	CH ₂ -Gr.				29,5
groß (5&6)	31,20	CH ₂ -Gr.	CH ₂ -Gr.		31	
mittel (5&6)	31,28	CH ₂ -Gr.	CH ₂ -Gr.		31	
klein (5&6)	31,42	CH ₂ -Gr.	CH ₂ -Gr.		31	
klein (5&6)	31,76	CH ₂ -Gr.	CH ₂ -Gr.		31	
klein	32,50	CH ₂ -Gr.				
klein	32,59	CH ₂ -Gr.				
groß (7 ₁)	33,07	CH-Gr.	CH-Gr.	CH-Gr.	32,5	32,3
groß (7 ₂)	33,09	CH-Gr.	CH-Gr.	CH-Gr.	32,5	32,4
groß (?)	33,38	CH ₂ -Gr.	CH ₂ -Gr.		33,5	33-38
groß (?)	34,22	CH ₂ -Gr.	CH ₂ -Gr.		34,5	33-38
klein (?)	34,70	CH ₂ -Gr.	CH ₂ -Gr.		34,5	33-38
mittel (?)	35,70	CH ₂ -Gr.	CH ₂ -Gr.		35-38	33-38
mittel (?)	35,96	CH ₂ -Gr.	CH ₂ -Gr.		35-38	33-38
mittel (?)	36,00	CH ₂ -Gr.	CH ₂ -Gr.		35-38	33-38
klein (?)	36,20	CH ₂ -Gr.	CH ₂ -Gr.		35-38	33-38
mittel (?)	36,55	CH ₂ -Gr.	CH ₂ -Gr.		35-38	33-38
mittel (?)	36,62	CH ₂ -Gr.	CH ₂ -Gr.		35-38	33-38
mittel	36,84	CH-Gr.		CH-Gr.		34,1
mittel (?)	36,90	CH ₂ -Gr.	CH ₂ -Gr.		35-38	33-38
mittel (?)	37,00	CH ₂ -Gr.	CH ₂ -Gr.		35-38	33-38
groß (?)	37,14	CH ₂ -Gr.	CH ₂ -Gr.		35-38	33-38
groß (?)	37,24	CH ₂ -Gr.	CH ₂ -Gr.		35-38	33-38
mittel (?)	37,40	CH ₂ -Gr.	CH ₂ -Gr.		35-38	33-38
groß (?)	37,60	CH ₂ -Gr.	CH ₂ -Gr.		35-38	33-38
mittel (?)	37,90	CH ₂ -Gr.	CH ₂ -Gr.		35-38	33-38
mittel	38,19	CH-Gr.	CH-Gr.		38,5	40,1
mittel	38,29	CH-Gr.	CH-Gr.		38,5	40,1
groß	39,09	CH-Gr.	CH-Gr.		39,5	40,1

4 Ergebnisse und Diskussion

4.3 Charakterisierung der Tetraetherlipid-Fraktion

Signal- intensität (Signal im Spektrum)	Messung		Zugeordnete Gruppe		ppm-Werte	
	ppm	Gruppe	<i>Literatur</i> [99,100,102,103]	<i>BioChem- Draw</i> ^[98]	<i>Literatur</i> ^[99] 100,102,103]	<i>BioChem- Draw</i> ^[98]
klein	39,50	CH ₂ -Gr.	CH ₂ -Gr.		35-38	
mittel	44,80	CH-Gr.	CH-Gr.		45	40,1
klein	45,00	CH-Gr.	CH-Gr.		45	40,1
mittel	45,60	CH-Gr.	CH-Gr.		45	40,1
mittel	46,42	CH-Gr.	CH-Gr.		45	40,1
mittel (a)	62,96	CH ₂ -Gr.	CH ₂ -Gr.		62,98	61,6
klein (p)	63,04	CH ₂ -Gr.	CH ₂ -Gr.		63,04	64,2
mittel (d&g)	68,52	CH ₂ -Gr.	CH ₂ -Gr.		68,59	65,5 & 65,8
mittel (d&g)	68,72 & 68,81	CH ₂ -Gr.	CH ₂ -Gr.		68,82 & 68,86	65,5 & 65,8
mittel (e&f)	70,06 & 70,11	CH ₂ -Gr.	CH ₂ -Gr.		70,05 & 70,14	68,0 & 68,3
mittel (j)	70,60	CH ₂ -Gr.	CH ₂ -Gr.		70,54	68,9
klein (i)	70,73	CH ₂ -Gr.	CH ₂ -Gr.		70,59	68,9
mittel (c)	71,10	CH ₂ -Gr.	CH ₂ -Gr.		71,07	71,6
klein (c)	71,22	CH ₂ -Gr.	CH ₂ -Gr.		71,1	71,6
klein (h)	71,54	CH ₂ -Gr.	CH ₂ -Gr.		71,62	71,9
klein (m)	75,04	CH-Gr.	CH-Gr.		75,03	71,2
klein (n)	76,10	CH-Gr.	CH-Gr.		76,15	71,2
kein Signal	77,00	C _{quartär} des CHCl ₃				
klein (i)	77,82	CH-Gr.	CH-Gr.		77,84	80,8
mittel (b)	78,43	CH-Gr.	CH-Gr.		78,44	82,7
kein Signal (o)	80,47	C _{quartär}			80,46	78,4
klein (l)	81,27	CH-Gr.	CH-Gr.		81,24	68,7
klein (k)	90,83	CH-Gr.	CH-Gr.		90,86	79,6

Aus der Tabelle 13 und den oben gezeigten Spektren wird deutlich, dass eine Aufteilung der Spektren in kleine Gruppen sehr wichtig ist. Daher werden die Spektren, wie das ¹H-Spektrum, auch in Bereiche eingeteilt, die schon in der Tabelle 13 vorkommen (Signal im Spektrum bzw. Struktur).

4 Ergebnisse und Diskussion

4.3 Charakterisierung der Tetraetherlipid-Fraktion

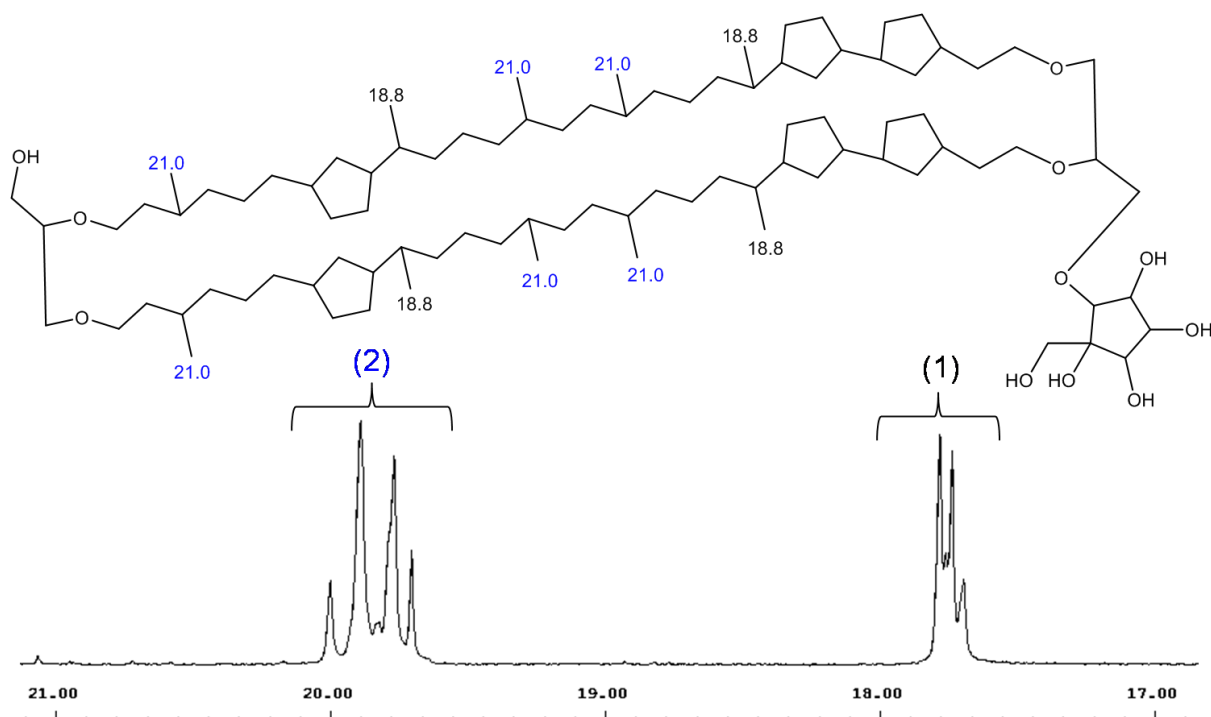


Abbildung 4.29 - CH₃-Gruppen Signale im 700 MHz-¹³C-NMR-Spektrum

Aus Abbildung 4.29 wird sichtbar, dass die berechneten zwei Signale für die Methylgruppen bei 18,8 ppm, Signal (1) (schwarz dargestellt), und 21,0 ppm, Signal (2) (blau dargestellt), liegen. Im Vergleich der zwei im Spektrum gefundenen Signale mit den berechneten Signalen, wird sichtbar, dass die Signale minimal abweichen und an der richtigen Stelle liegen. Das Signal (1) liegt bei 17,7-17,8 ppm (17,75 ppm *de Rosa et al.*^[103]) und das Signal (2) bei 19,8 ppm (19,8 ppm *de Rosa et al.*^[103]). *Bode et al.*^[99] veröffentlichten hierzu auch eine NMR-Untersuchung zu einer sehr ähnlichen Lipid-Struktur, denn sie besitzt nur vier der 5er-Ringe. Von der in Abbildung 4.29 dargestellten Struktur fehlt bei *Bode et al.*^[99] von beiden benachbarten 5er-Ringen der, welcher näher an der Etherbrücke sitzt (und dies in beiden Ketten). Diese Struktur wird daher als Vergleich herangezogen. Hier zeigt sich, dass unsere Messung mit denen von *Rosa et al.* besser übereinstimmt. Das niedrige Signal liegt nach *Bode et al.*^[99] bei 18 ppm und das höhere bei 20 ppm. Die Abbildungen 4.29 bis 4.34 sind DEPT-135-Spektren. Die ¹³C-Spektren werden hier nicht abgebildet, da das DEPT-135-Spektrum sofort zeigt, um welchen Gruppentyp es sich handelt. Hier bedeutet ein positives Signal, dass es sich um CH oder CH₃-Gruppen handelt. Zeigt das Signal eine negative Intensität, so ist es eine CH₂-Gruppe. Die Struktur besitzt nur einen quartären Kohlenstoff (bei 80,47 ppm), der in einem DEPT-135-Spektrum nicht sichtbar ist. Die beiden in Abbildung 4.29 gezeigten Signale können also als richtig eingestuft werden,

4 Ergebnisse und Diskussion

4.3 Charakterisierung der Tetraetherlipid-Fraktion

denn die Signale zeigen die richtigen ppm-Werte und eine positive Intensität, was beides für die CH₃-Gruppen spricht.

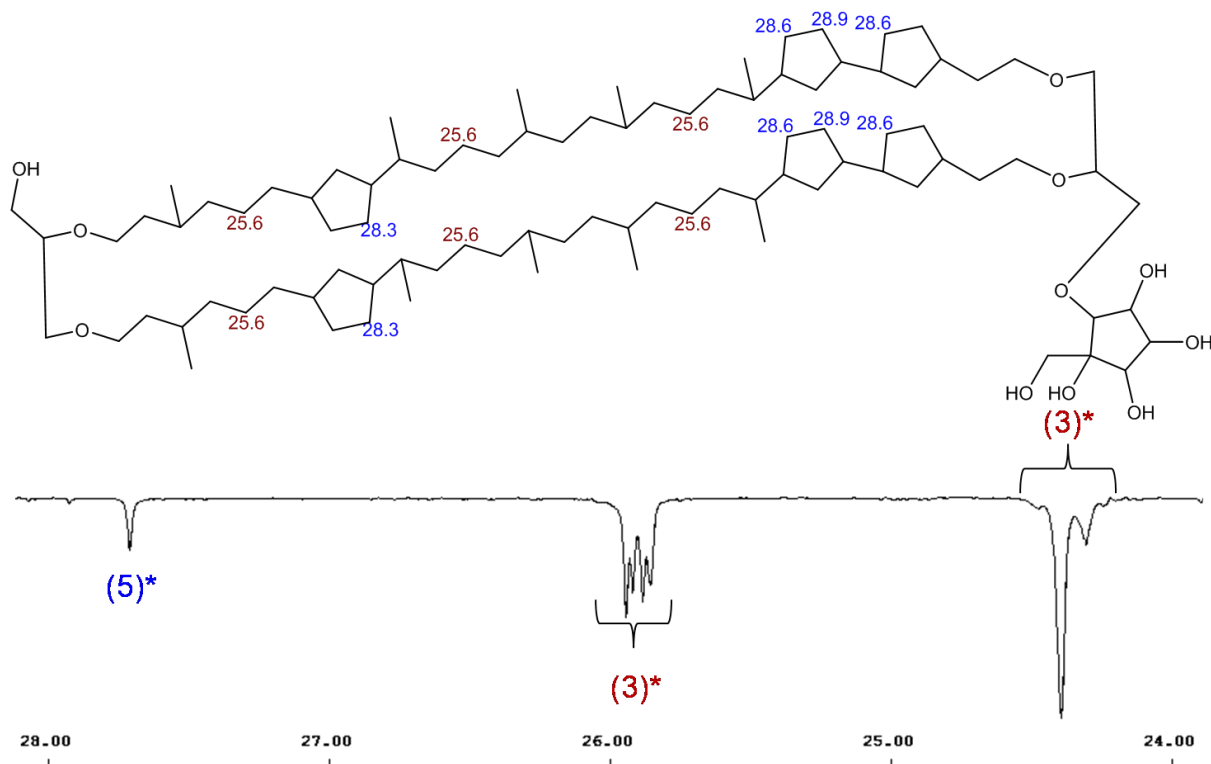


Abbildung 4.30 - ¹³C-Signale im 700 MHz-DEPT-135-Spektrum - Bereich 24-28 ppm

Abbildung 4.30 zeigt die Signale (3) (rot) und (5) (blau). Beide Signale stehen in der Struktur für CH₂-Gruppen, was auch das DEPT-135-Spektrum belegt, da die Signale negativ sind. Da die Signale von den berechneten Werten abweichen, werden sie hier kurz diskutiert. Signal (3) sollte bei 25,6 ppm auftauchen, erscheint jedoch aufgetrennt bei 24,5 ppm und bei 25,9 ppm, genau wie bei *Bode et al.*^[99] auch (24,5 und 26 ppm). Signal (5) sollte zwischen 28,3 und 28,9 ppm liegen. Hier ist es zum Einen erstaunlich, dass dieses Signal ein scharfes Singulett ist und zum Anderen, dass *Bode et al.*^[99] dort kein Signal finden. Es könnte auch sein, dass das tieffeldverschobene zweite Signal (3) zum Signal (5) gehört, dies kann jedoch erst mit den 2D-Spektren (Abbildung 4.32 / 4.33 / 4.34) geklärt werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.3 Charakterisierung der Tetraetherlipid-Fraktion

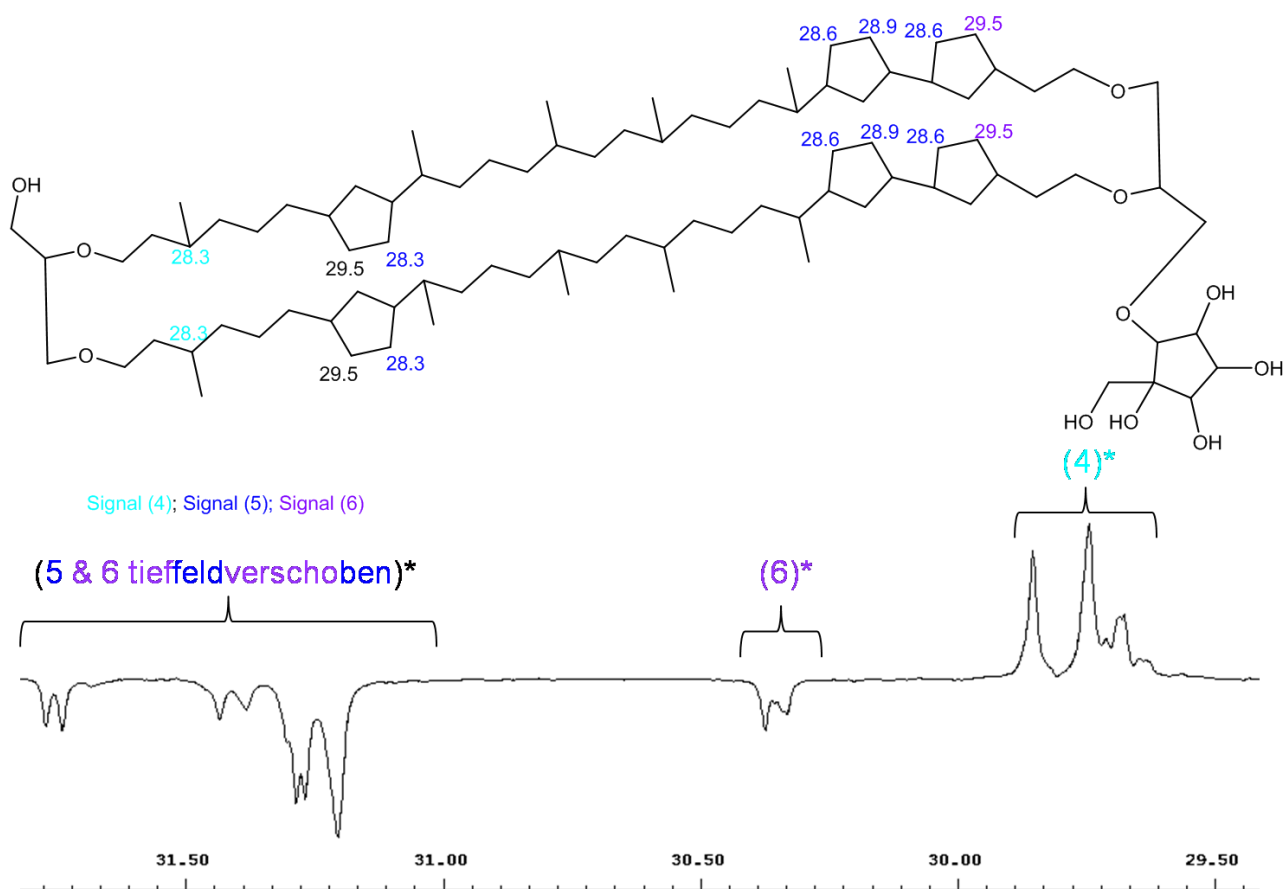


Abbildung 4.31 - ^{13}C -Signale im 700 MHz-DEPT-135-Spektrum - Bereich 29,5-32 ppm

In Abbildung 4.31 sind im Wesentlichen drei Signalgruppen sichtbar. Signal (4) (türkis) zeigt CH-Gruppen (alle CH_3 -Gruppen wurden schon zugeordnet), da das Signal positiv ist, Signal (5 & 6) sind negativ, stellen also CH_2 -Gruppen dar. Beides passt sehr gut zur Struktur. Signal (4) liegt mit 29,75 ppm etwas höher als der berechnete ppm-Wert von 28,3 ppm. Signal (6) (violett) liegt mit ca. 30,4 ppm ebenfalls knapp 1 ppm höher als berechnet. Im Bereich um 31,5 ppm liegen noch einige Signale, die nicht genau zugeordnet werden können, aber da die Signale in der Nähe von Signal (5 & 6) liegen, wurden sie formal diesen zugeordnet. Dieser Bereich weicht von *Bode et al.*^[99] recht stark ab, denn dort ist bei 31 ppm eine CH_2 -Gruppe und bei 30 und 32,5 ppm mehrere CH-Gruppen (und keine CH_2 -Gruppen). An dieser Stelle sollte nochmals betont werden, dass bei den Lipidstrukturen die Anzahl der 5er-Ringe variieren kann, was eine gewisse Fehlerbehaftung nach sich zieht, außerdem ist die Auflösung des ^{13}C -Literaturspektrums nicht gut, so dass ein 30 ppm Signal nicht klar von einem 31 ppm Signal unterschieden werden kann.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.3 Charakterisierung der Tetraetherlipid-Fraktion

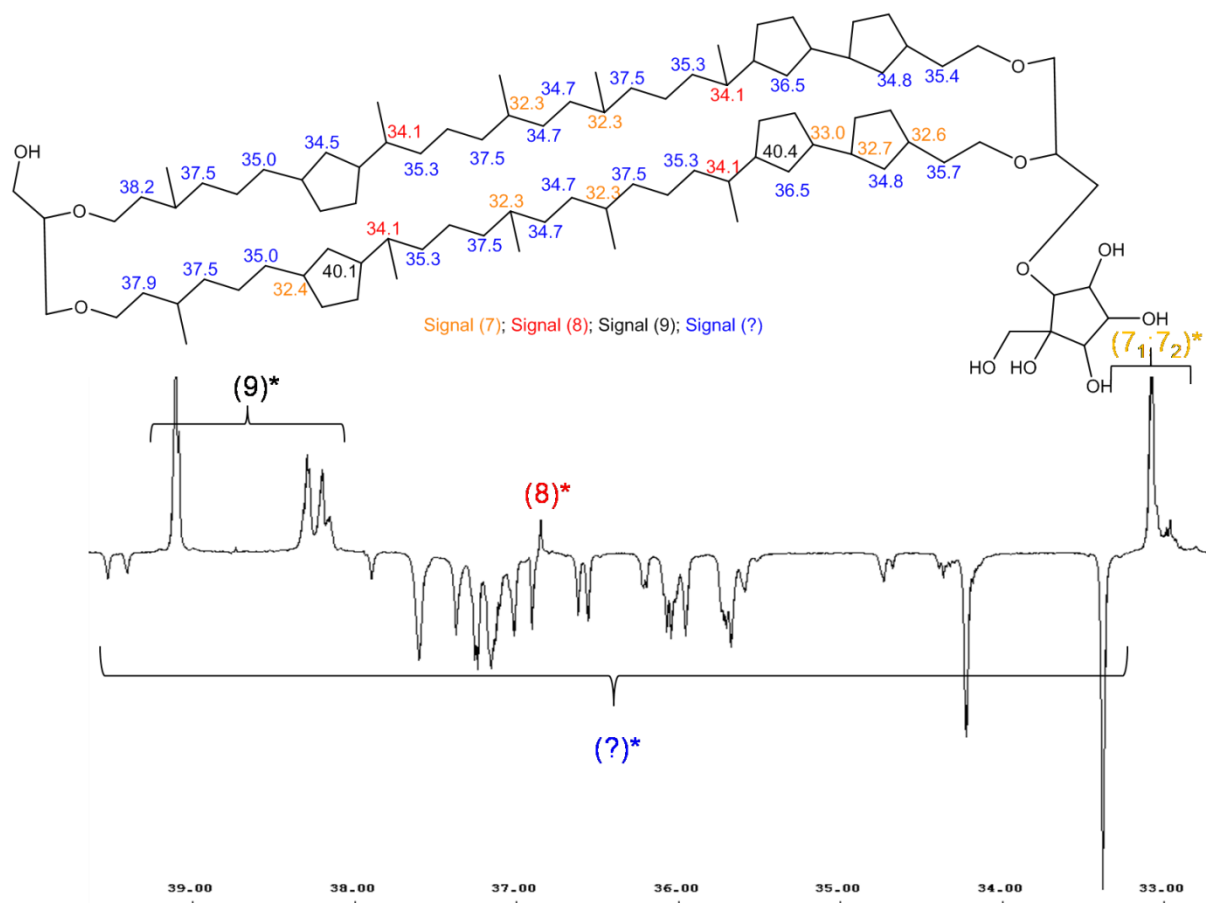


Abbildung 4.32 - ^{13}C -Signale im 700 MHz-DEPT-135-Spektrum - Bereich 33-40 ppm

In Abbildung 4.32 wird die Signaldichte sehr hoch, aber ein paar Signale lassen sich gut über das DEPT-135-Spektrum unterscheiden. Signal (7) (gelb) und (8) (rot) zeigen drei verschiedene CH-Gruppenkombinationen. Signal (7) sollte bei 32,3-33 ppm liegen. *Bode et al.* beschreiben ebenfalls bei 32,5 ppm CH-Signale. Das DEPT-135-Spektrum zeigt hier auch ein CH-Signal mit einigen kleinen Peaks in der direkten Umgebung. Signal (8) sollte bei 34,1 ppm liegen und ist stark tieffeldverschoben bei 36,8 ppm. Das Signal kann aufgrund der positiven Intensität als richtig erachtet werden. Das Signal wurde von *Bode et al.*^[99] weder erwähnt noch gemessen. Signal (9) zeigt ein Kohlenstoff-Multiplett bei 38,2 ppm und ein Kohlenstoff-Singulett bei 39 ppm. Diese passen sehr gut zu *Bode et al.*^[99] 38,5 und 39,5 ppm (ebenfalls CH-Signal). Berechnet wurde die Signalposition für 40,1 ppm. Das blaue Fragezeichen deckt eine breite Signalkette von CH_2 -Signalen ab, die nicht genau zugeordnet werden können. Sie stellen das größte Problem der Auswertung dar, da diese Signale durch verschiedene Strukturen auseinandergezogen werden und tieffeld- oder hochfeldverschoben werden können und es offensichtlich auch sind.

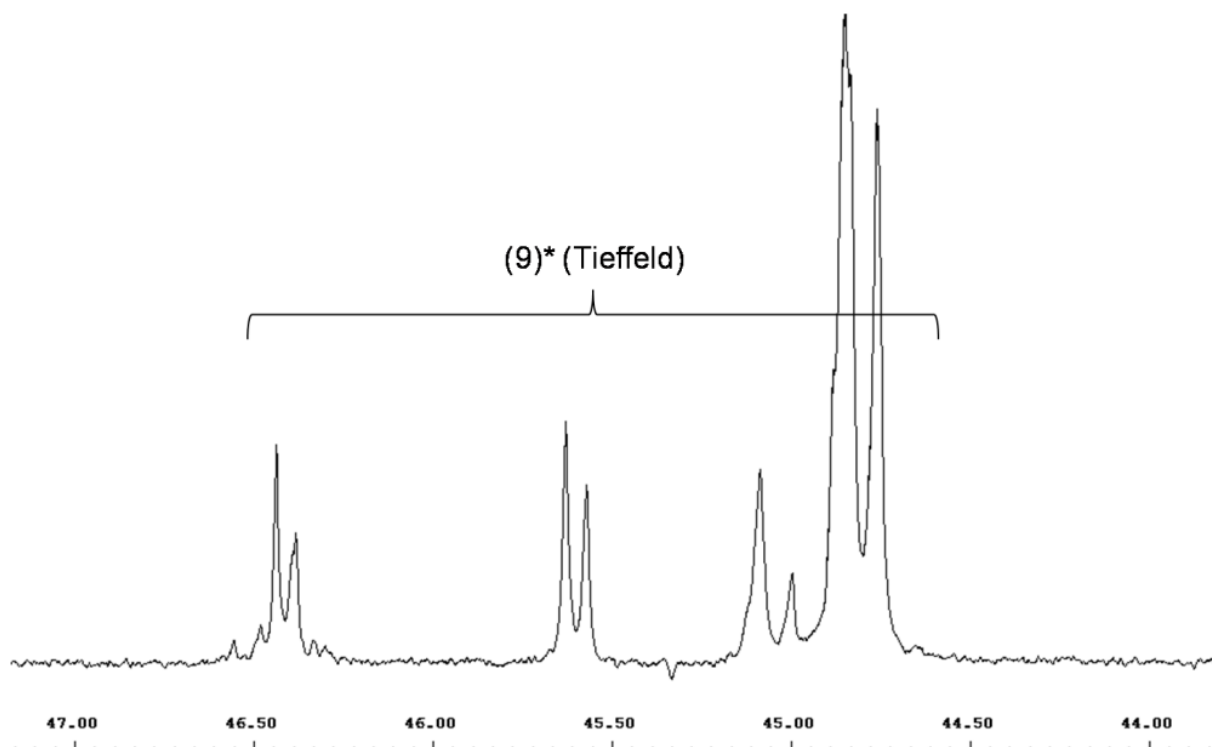


Abbildung 4.33 - ^{13}C -Signale im 700 MHz-DEPT-135-Spektrum - Bereich 44-47 ppm

In Abbildung 4.33 zeigen sich in einem ppm-Bereich von 44,6-46,5 ppm mehrere Dublett Signale mit einem Dacheffekt. Berechnet wurden dort aber keine Signale, daher ist eine Zuordnung schwierig. *Bode et al.*^[99] fanden bei 45 ppm nur ein einzelnes Signal, also spricht hier die Abweichung eher für eine Variation der Struktur.

Abbildung 4.34 zeigt sechzehn Signale, welche mit den Buchstaben a bis p bezeichnet werden. Sie lassen sich über das DEPT-135-Spektrum fehlerfrei zuordnen. Jede theoretische CH_2 -Gruppe entspricht einer empirischen CH_2 -Gruppe, gleiches gilt auch für die CH-Gruppen, denn all ihre Signale sind positiv. Signal (o) ist ein quartärer Kohlenstoff, der im DEPT-Spektrum nicht zu sehen ist. Dies passt genau, da an dieser Stelle im DEPT-Spektrum kein Signal ist. An dieser Stelle sollten auch die drei Signale vom CDCl_3 zwischen Signal (i) und (n) erwähnt werden. Sie sind quartäre Kohlenstoffsignale und daher im DEPT-Spektrum nicht (bzw. als Artefakt) sichtbar. Im ^{13}C -Spektrum hingegen sind sie an der zu erwartenden Stelle. Die Signale im C-O-Bereich der Struktur passen nicht gut zu den berechneten Werten, was sich natürlich negativ auf die Aussagekraft der vorhergegangenen berechneten Werte auswirkt. Im Gegensatz zu den berechneten Werten weichen die veröffentlichten Daten von *Bode et al.*^[99] nur sehr wenig von den NMR-Untersuchungen des Lipides ab, was deren Aussagekraft im Bezug auf die Auswertung unterstreicht.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.3 Charakterisierung der Tetraetherlipid-Fraktion

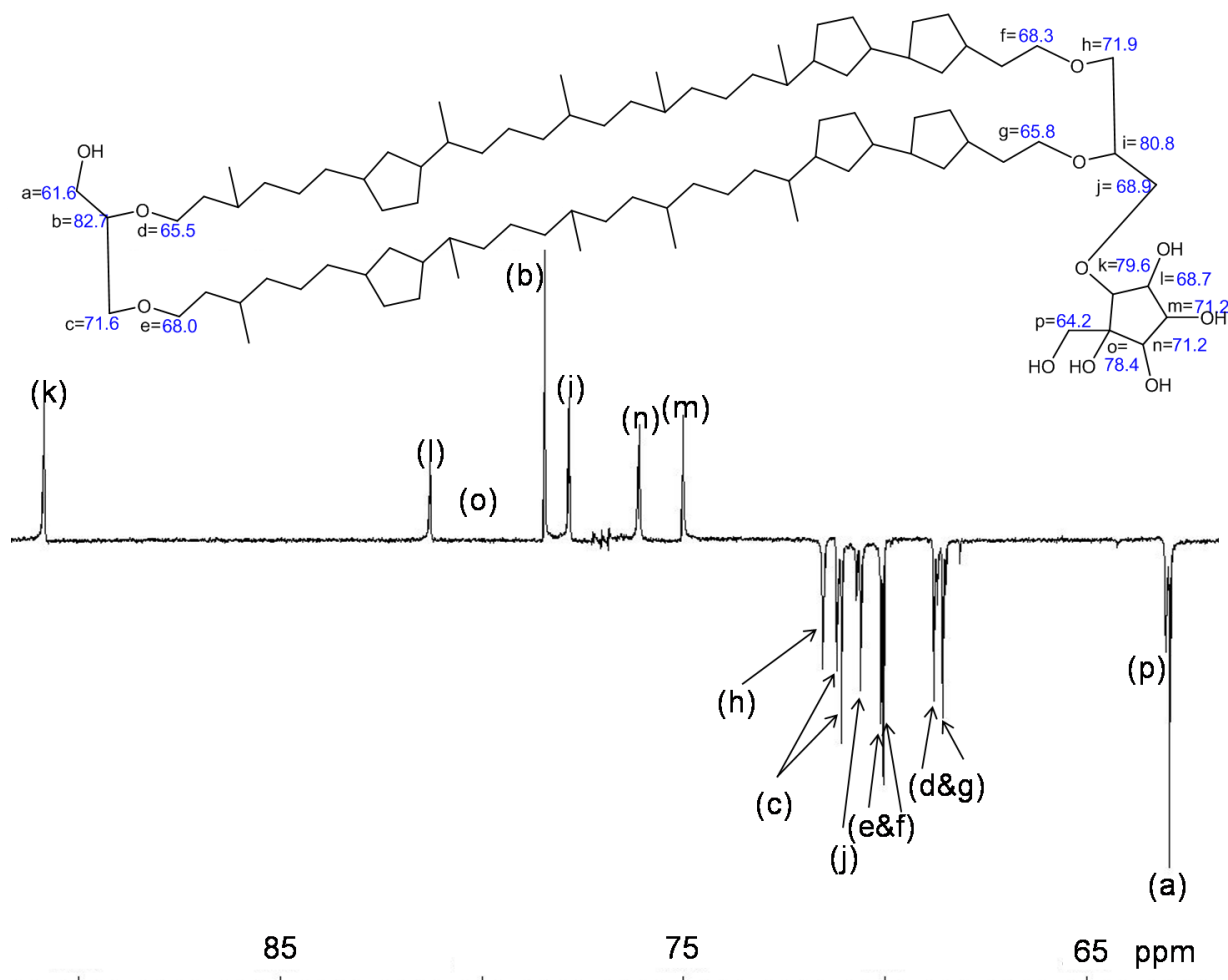


Abbildung 4.34 - ^{13}C -Signale im 700 MHz-DEPT-135-Spektrum - Bereich 64-90 ppm

Es folgt die Auswertung der Kohlenstoffe außerhalb des Rückgrades des Lipids. Diese werden in Abbildung 4.34 mit Buchstaben gekennzeichnet. Sie beginnt mit den dort vorhandenen Methylen-Gruppen (a, c, f, g, h, j): Der ppm-Wert für Signal (a) wurde mit 61,6 ppm berechnet und befindet sich im Spektrum bei 62,96 ppm (62,98 ppm^[99]); Bei Signal (p) weicht der berechnete Wert 59,03 ppm stark vom im Spektrum gefundenen Wert bei 63,04 ppm (63,04 ppm^[99]) ab. Die ppm-Werte für die Signale (c & h) wurden berechnet mit 71,6 / 71,9 ppm und befinden sich im Spektrum bei 71,54 / 71,22 / 71,9 ppm (71,07 / 71,1 / 71,62 ppm^[99]). Signale (d & g) wurden mit 65,5-65,8 ppm berechnet und befinden sich im Spektrum bei 68,52 / 68,72 / 68,81 ppm (68,59 / 68,82 / 68,86 ppm^[99]). Des Weiteren berechnete *BioChemDraw*^[98] die ppm-Werte für Signale (e & f) mit 68,0-68,3 ppm, diese befinden sich im Spektrum bei 70,06 / 70,11 ppm (70,05 / 71,14 ppm^[99]). Zuletzt folgt der ppm-Wert für Signal (j), welcher mit 70,7 ppm berechnet wurde und sich im Spektrum bei 70,6 / 70,73 ppm (70,54 / 70,59 ppm^[99]) befindet. Die erste aufgezählte CH-Gruppe weicht in der

Messung sehr stark von dem berechneten Wert ab. Signal (b) wurde mit 82,7 ppm berechnet. Gemessen wurden aber 77,82 ppm, was auch *Bode et al.*^[99] mit 78,44 ppm bestätigen. Bei Signal (i) passt der berechnete Wert wieder sehr gut, denn berechnet wurden 80,9 ppm und gefunden 77,82 ppm (77,84 ppm^[99]). Eine ebenfalls sehr große Abweichung zwischen Messwert und berechnetem Wert lieferte Signal (k). Hier wurde ein ppm-Wert von 77,6 berechnet und im Spektrum bei 90,83 ppm (90,86 ppm^[99]) gefunden. Signal (l) weicht ebenfalls stark von den ppm-Werten ab. Es wurde mit 68,7 ppm berechnet und lag im Spektrum bei 81,27 ppm. *Bode et al.*^[99] unterstützen dieses Messergebnis, da sie einen Wert von 81,24 ppm angeben. Für die Signale (m & n) wurde nur ein Wert von 71,2 ppm berechnet und im Spektrum befinden sich zwei Signale bei 75,04 / 76,10 ppm (75,03 / 76,15 ppm^[99]). Letztlich kommt der ppm-Wert des quartären Kohlenstoffes von Signal (o), welcher mit 76,9 ppm berechnet wurde. Im ¹³C-Spektrum befindet es sich bei 80,47 ppm was *Bode et al.*^[99] mit 80,46 ppm bestätigen.

4.3.1.4 Zusammenfassung der Kohlenstoff-Spektren

Die Kohlenstoffe außerhalb der Etherbrücken (Abbildung 4.34 a-p) können zweifelsfrei zugeordnet werden. Die Kohlenstoffe des Rückgrates zwischen den Etherbrücken lassen sich nur teilweise zuordnen, einige Signale konnten auch gar nicht zugeordnet werden. Insgesamt liegen die Messungen in den erwarteten Bereichen. Die Gruppentypen (CH / CH₂ / CH₃) stimmen immer mit denen der Literatur überein. Es ist also zweifelsfrei ein Tetraetherlipid, aber die genaue Struktur kann aufgrund von Isomeren nicht ermittelt werden. Weitere Fakten hierzu nach der Massenspektrometrie (Kapitel 4.3.2).

4.3.1.5 2D-¹H-¹³C-Spektren

Auf eine genaue Auswertung des 2D-¹H-¹³C-Spektrum soll an dieser Stelle verzichtet werden. Lediglich die beiden ungeklärten Triplets des Protonenspektrums (Abbildung 4.21) sollen hier anhand von Abbildung 4.35 den entsprechenden Kohlenstoffen zugeordnet werden. Die beiden Triplets koppeln mit einander und liegen in CH₂-Gruppen, was das DEPT-135-Spektrum zeigt (Abbildung 4.35). Das Protonen-Signal bei 2,76 ppm koppelt mit einem Kohlenstoff bei 37,9 ppm. Das 2,16 ppm-Proton koppelt mit einem Kohlenstoff bei 27,5 ppm. Dieser Kohlenstoff ist in Abbildung 4.30 als Signal (5)* bezeichnet. Es konnte aber nicht fest gestellt werden, wo dieser Kohlenstoff in der Struktur liegt, es kann sich um eine unbekannte Verunreinigung handeln.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.3 Charakterisierung der Tetraetherlipid-Fraktion

Weitere Informationen sind dem 2D- ^1H - ^{13}C -Spektrum nur schwer zu entnehmen, denn die Signale überlagern einander so stark, dass keine klaren Umrisse der Signale sichtbar sind. Auswertungsaussagen würden daher nicht durch Beweise sondern, nur durch Vermutungen untermauert. Es bestände nur eine Chance, die Genauigkeit der Auswertung zu erhöhen, wenn die Mess-Parameter des NMRs variiert würden, um eine bessere Auflösung zu erreichen. Weiterhin wären neben den verwendeten Verfahren noch weitere notwendig, die mehr Informationen zu den einzelnen Protonen und Kohlenstoffen ergeben. Hierzu wären z.B. neben $^1\text{H} / ^{13}\text{C}$ -HSQC- (zeigen C-H Kopplung bei direkter Bindung), $^1\text{H} / ^1\text{H}$ -COSY- (zeigen Kopplung über max. 3 Bdg.), $^1\text{H} / ^1\text{H}$ -TOCSY- (zeigen Kopplung über max. mehr als 3 Bdg.), $^1\text{H} / ^1\text{H}$ -NOESY- (zeigen Kopplung über die Raumstruktur) und/oder HMBC-Spektren (zeigen C-H Kopplung über 3 Bdg. stark und über 2+4 Bdg. schwach) interessant. Sie würden weitere Spektren und Signale liefern und am Ende dieser Auswertung könnte dann vielleicht eine genaue Struktur herauskommen. Jedoch nur, wenn es sich um **ein** Isomer handelt, aber die Problematik ist ja schon mehrfach erwähnt worden, dass Naturstoffe Variationen der Struktur besitzen. Das Massenspektrum bestätigte dies schon im Verlauf der Arbeit. Tabelle 14 zeigt eine genaue Auflistung der im 2D-Spektrum gefundenen Korrelationen zwischen Protonen und Kohlenstoff-Signalen. Über das DEPT-135-Spektrum wurden die Gruppentypen zugeordnet.

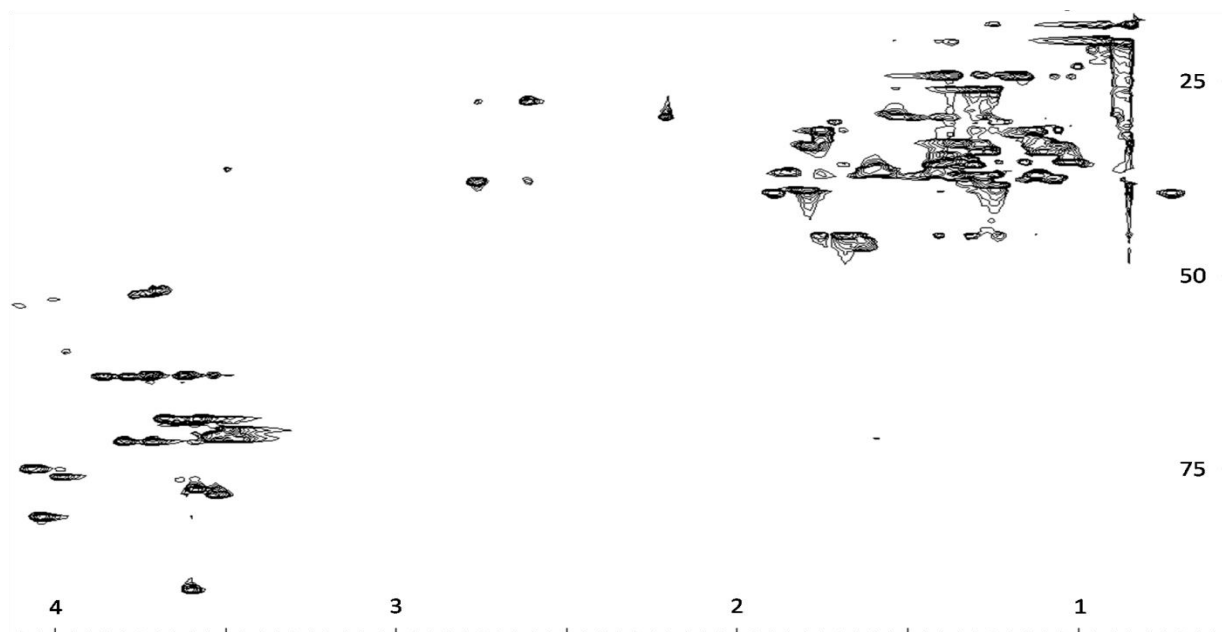


Abbildung 4.35 - 700 MHz-2D- ^1H - ^{13}C -Spektrum (senkrecht ^{13}C -Spektrum 15-100 ppm, waagrecht ^1H -Spektrum von 0-4 ppm)

4 Ergebnisse und Diskussion

4.3 Charakterisierung der Tetraetherlipid-Fraktion

Tabelle 14 - 2D- ^1H - ^{13}C -ppm-Werte: ^1H und ^{13}C -ppm-Wert separat aufgetragen. Die Gruppen wurden dem DEPT-135-Spektrum entnommen

2D- ^1H - ^{13}C -ppm-Werte-Tabelle								
^1H -ppm Wert	^{13}C -ppm Wert	Gruppe	^1H -ppm Wert	^{13}C -ppm Wert	Gruppe	^1H -ppm Wert	^{13}C -ppm Wert	Gruppe
0,72	39,32	CH ₂	1,29	37,02	CH ₂	2,76	37,95	CH ₂
0,84	38,27	CH	1,31	35,62	CH ₂	3,49	70,11	CH ₂
0,85	17,68	CH ₃	1,35	32,93	CH	3,52	62,98	CH ₂
0,85	33,04	CH ₂	1,37	35,38	CH ₂	3,52	78,30	CH
0,87	19,85	CH ₃	1,38	24,27	CH ₂	3,58	68,59	CH ₂
0,88	29,43	CH	1,41	35,73	CH ₂	3,58	77,59	CH
1,02	35,38	CH ₂	1,52	29,53	CH	3,60	90,69	CH
1,05	33,28	CH ₂	1,60	36,32	CH ₂	3,62	63,94	CH ₂
1,07	37,49	CH ₂	1,63	46,14	CH	3,68	68,47	CH ₂
1,10	34,10	CH ₂	1,68	44,97	CH	3,71	51,96	CH
1,13	31,29	CH ₂	1,71	30,24	CH ₂	3,71	71,40	CH ₂
1,13	37,02	CH ₂	1,76	31,17	CH ₂	3,73	62,86	CH ₂
1,16	24,39	CH ₂	1,79	33,28	CH ₂	3,79	63,09	CH ₂
1,24	38,19	CH	1,80	39,12	CH	3,80	71,40	CH ₂
1,25	25,91	CH ₂	1,85	36,67	CH	3,85	62,98	CH ₂
1,25	37,02	CH ₂	1,89	39,47	CH ₂	3,98	75,84	CH
1,27	34,10	CH ₂	2,20	29,65	CH	4,04	81,45	CH
1,29	25,79	CH ₂	2,61	27,55	CH ₂	4,06	75,14	CH

4.3.2 Massenspektrometrie des Tetraetherlipides

Wird das gesamte Massenspektrum betrachtet, fällt der Signalpeak der ganzen nicht so fragmentierten Struktur fast nicht auf, bei m/z ca. 1480 zeigt sich ein kleines Signal, welches das Zielmolekül darstellt. Wird dieser Bereich vergrößert, so wird eine Signalfolge von m/z 1477-1482 sichtbar. Dieser Massenbereich zeigt aufgeschlüsselt drei Massenpeaks (Abbildung 4.36), die über die entsprechende Isotopenverteilung wiederum mehrere Peaks ergeben. Die angenommene Struktur des Lipides sollte ein Signal bei m/z 1452,33 liefern. Bei der Messmethode liegt ein Messartefakt vor, welches einen Massenfehler von m/z 22,9898 (Na) verursacht. Ein ungeladenes Lipidmolekül benötigt für die eigene Ionisierung (Thermodesorptions-MS) ein leicht ionisierbares Atom (hier ein Natriumion)^[91]. Hierzu sind nur sehr geringe Mengen von Natrium nötig. Es reicht aus, wenn die Probe vor der MS-Prozedur in einem Glasgefäß oder einer Glaspipette in Kontakt gekommen ist. Des Weiteren ist auch Natrium in der

4 Ergebnisse und Diskussion

4.3 Charakterisierung der Tetraetherlipid-Fraktion

Probenlösung vorhanden, da der pH-Wert der Calcium- und Phosphatlösungen mit NaOH und HCl eingestellt wurde.

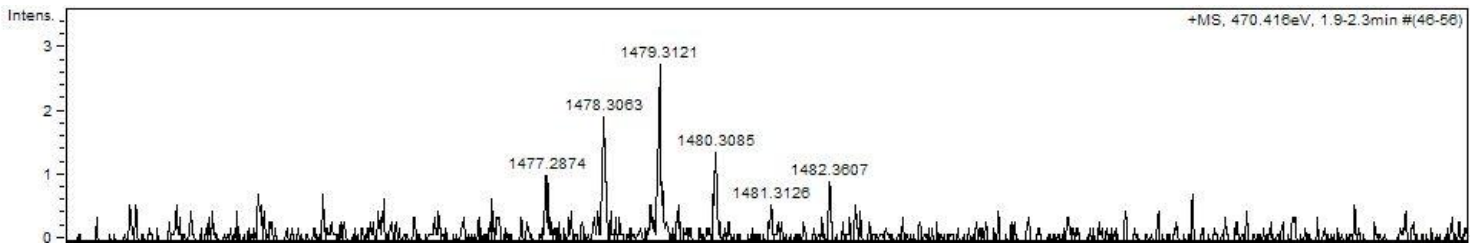


Abbildung 4.36 - Vergrößerung des Molekülpeaks im Massenspektrum

Damit die Auswertung der Massenspektren klar wird, muss die Reversibilität der Bildung oder Auflösung eines 5er-Ringes klar sein. Bei dieser enzymatisch katalysierten Reaktion werden 2 Wasserstoffatome abgegeben oder angelagert. Abbildung 4.37 zeigt diese Reaktion.

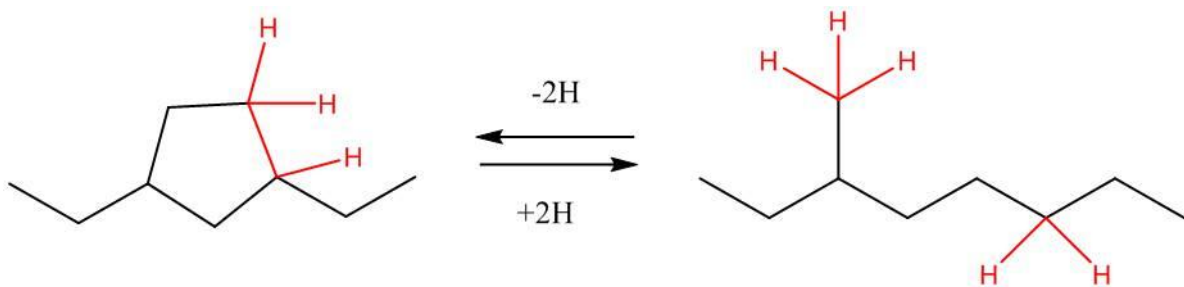


Abbildung 4.37 - Mechanismus der 5er-Ring-Öffnung im Rückgrad des Lipides bei der Biosynthese

Wird ein Ring aufgelöst, so wird die mit der Kette verbundene CH-Gruppe unter Wasserstoffanlagerung zu einer CH_2 -Gruppe. Die zu dieser Gruppe in α -Position stehende CH_2 -Gruppe wird unter Anlagerung eines Wasserstoffes in eine CH_3 -Gruppe umgewandelt. Daher variiert die Masse des Signales um ein Vielfaches von zwei, da in der Summe zwei Wasserstoffe abgegeben werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.3 Charakterisierung der Tetraetherlipid-Fraktion

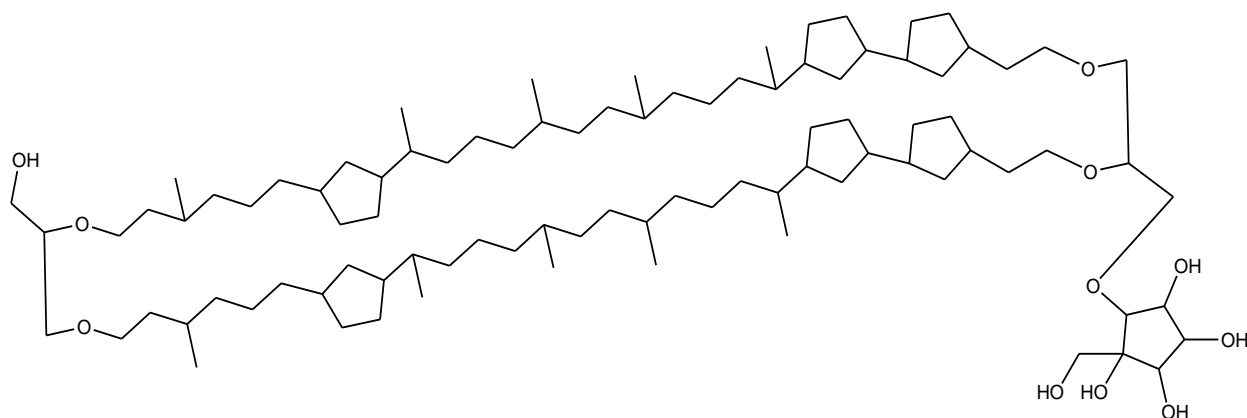


Abbildung 4.38 - Angenommene Struktur des Lipides

Die angenommene Struktur, welche in Abbildung 4.38 dargestellt wird, liefert eine Molekülmasse von $1452,33 + 22,989$ (Natriumfehler) also m/z 1475,36. Erstaunlicherweise finden wir keinen Peak bei m/z 1475,36. Der niedrigste Wert liegt bei m/z 1477,28. Daher ist die Annahme einer Struktur mit sechs 5er-Ringen falsch. Der 1477,28er Peak würde zu einer Struktur mit fünf 5er-Ringen passen (Abbildung 4.39).

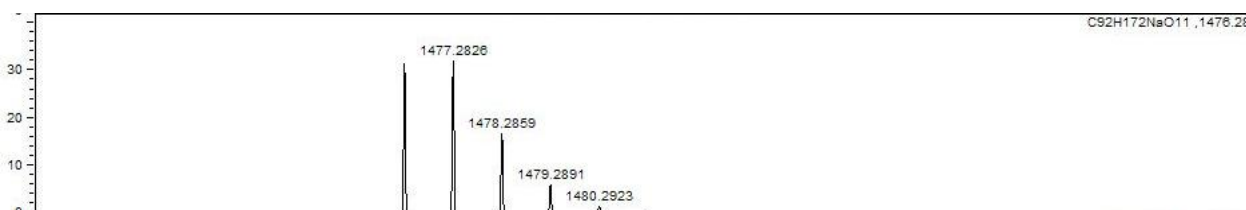


Abbildung 4.39 - Massenspektrenausschnitt mit einem Peak bei m/z 1477,28

Betrachten wir nun die nächste Abbildung, sehen wir das Signal bei m/z 1479,30. Dieses Signal würde zu einer Struktur mit vier 5er-Ringen passen (Abbildung 4.40).

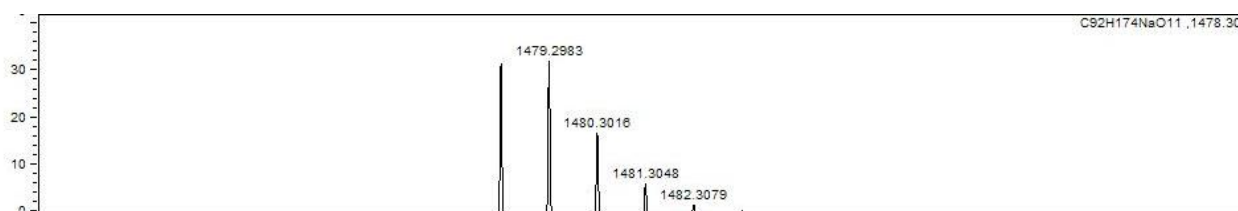


Abbildung 4.40 - Massenspektrenausschnitt mit einem Peak bei m/z 1479,30

4 Ergebnisse und Diskussion

4.3 Charakterisierung der Tetraetherlipid-Fraktion

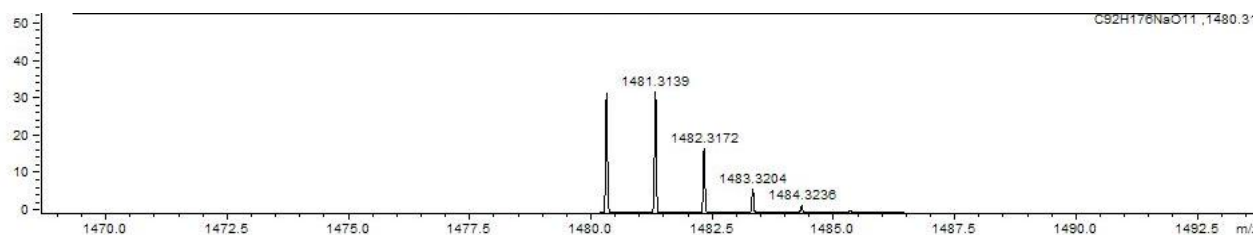


Abbildung 4.41 - Massenspektrenausschnitt mit einem Peak bei m/z 1481,31

Abbildung 4.41 zeigt ein Signal bei m/z 1481,31, was für diese Struktur eine Anwesenheit von nur noch drei 5er-Ringen in der Struktur bedeutet. Leider kann über das Massenspektrum keine Aussage über eine prozentuale Verteilung der Strukturen getroffen werden. Auch ist es nicht möglich, zu sehen oder Aussagen darüber zu treffen, welche der 5er-Ring-Variationen wahrscheinlicher sind als andere. Betrachtet man jetzt rückwirkend die NMR-Untersuchungen, so ist es nicht verwunderlich, dass manche Bereiche von den berechneten und Literatur-Spektren-Werten abweichen. Neben der NMR und MS wurden auch IR-Spektren des GDNT gemessen, siehe dazu Kapitel 4.5.3 und 4.7

4.3.3 Zusammenfassung von NMR- und Massenspektren des GDNT

In der NMR-Untersuchung stellte sich schon heraus, dass es sich wahrscheinlich um keine reine Substanz handelt. Der Verdacht verdichtete sich nach dem Auswerten der Protonen, Kohlenstoff (DEPT-135 und Standard ^{13}C) und 2D-Spektren. Auch wenn viele Signale im Protonenspektrum in den richtigen Bereichen der chemischen Verschiebung liegen und auch die Integrale realistische Werte liefern, die von der Literatur bestätigt wurden, ist dies bei der Kohlenstoff-NMR Untersuchung schwieriger. Hier konnten die Kohlenstoffe teilweise sehr genau zugeordnet werden (Umgebung der Etherbrücken und Zucker) aber das Rückgrat der Struktur, welches die 5er-Ringe enthält, konnte nicht genau aufgeschlüsselt werden. Die Methin-Gruppen, an denen alle Methyl-Gruppen sitzen, lagen in den zu erwartenden Bereichen. Problematisch sind die vielen Methylen-Gruppen, die sich nicht trennen ließen. Auch die 2D-Spektren besaßen in den entsprechenden Bereichen noch eine so hohe Überlagerung der Flächen, dass eine genaue Zuordnung nicht möglich war. Hier soll betont werden, dass die chemischen Verschiebungen der Methyl-Gruppen im NMR-Spektrum zwischen 25 und 35 ppm liegen, wo sie erwartet wurden. Die MS bestätigte die Vermutung der NMR-Spektroskopie, dass es sich um ein Gemisch von verschiedenen Lipiden handelt. Die Masse des Lipides wurde für m/z 1452,33 + m/z 22,99 durch Natriumanlagerung, also

4 Ergebnisse und Diskussion

4.3 Charakterisierung der Tetraetherlipid-Fraktion

m/z 1475, erwartet. Gefunden wurden jedoch m/z von 1477,28, 1479,30 und 1481,31. Das bedeutet: es sind ein bis drei 5er-Ringe weniger in der Struktur vorhanden. An dieser Stelle soll daher nochmals auf die Integrale des Protonenspektrums eingegangen werden. Die über die Anzahl der Protonen genau berechnete prozentuale Verteilung der vermuteten Struktur sollte für 30 Protonen (CH_3) bei 17,64 %, für 31 Protonen der O-Umgebung bei 18,23 % und für die restlichen 109 Protonen bei 64,12 % liegen. Die Veränderung der Protonenzahl würde bei 6 weiteren Protonen ($\text{C}_{92}\text{H}_{176}\text{O}_{11}$) hier folgende Veränderungen bewirken: 30 Protonen (CH_3) entsprechen 17,04 %, 31 Protonen der O-Umgebung 17,61 % und die restlichen 115 Protonen entsprechen 65,34 %. Bei den geringen Nachkommastellen in Abbildung 4.25 würde dieser Fehler nicht auffallen. Zusammenfassend ist das Lipid also ein Gemisch von Tetraetherlipiden mit drei bis fünf 5er-Ringen.

4.4 Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel in wässrigem Medium durch Tetraetherlipide

Nach der Charakterisierung des Lipides erfolgte die praktische Anwendung dieses Tetraetherlipides als Linker-Molekül zur Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel. Erste Versuche erfolgten mit einer Vorlage eines bestimmten Wasservolumens (10, 20 und 30 mL). Da keine Literaturstellen zu diesen Versuchsansätzen existieren, lagen keinerlei Anhaltspunkte vor, in welchen Konzentrationsbereichen ein Beginn der Experimente liegen würde. Somit wurden Wasservolumen, Calcium- und Phosphatlösung (Zugabevolumina und pH-Werte) und Lipidmenge variiert.

4.4.1 Versuchsreihen mit einem vorgelegten Wasservolumen von 10 mL

Die erste durchgeführte Reihe sollte sinnvolle Verhältnisse zwischen Wasser, Calcium-, Phosphat- und GDNT-Lösung ermitteln. Es wurden je 1, 2, 3, und 4 mL der Lösungen in 10 mL Wasservolumen gegeben. Die Darstellung der Partikel erfolgte wie in Abbildung 4.1 (Kapitel 4.1.1). Das Wasservolumen wurde vorgelegt, eine ethanolische GDNT-Lösung zugegeben, 20 s gerührt und dann über eine Peristaltikpumpe die Calcium- und Phosphatlösung gleichzeitig zugetropft. Nach 30 min Rühren wurden die Proben mit dynamischer Lichtstreuung untersucht. Die verwendete Lipid-Lösung wurde mit 1 g L^{-1} in Ethanol angesetzt. Die Löslichkeit des Lipides in Ethanol ist gut, so dass nach 1 min Ultraschallbehandlung des getrockneten Lipides in Ethanol eine klare, leicht gelbliche Lösung entstand. Mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung wurde bestätigt, dass es sich wirklich um eine Lösung und nicht um eine Dispersion handelte, denn es konnten keine Partikel gefunden werden. Bei der Frage, welche pH-Werte für die Calcium- und Phosphatlösungen gewählt werden sollten, wurde sich an den PAS-Reihe orientiert, denn dort stellten sich pH 8 und 9 als sinnvoll heraus, was auch für die GDNT-Reihen galt. Bei dieser ersten Reihe stellte sich eine geringe Menge der Lösungen (GDNT, Ca^{2+} und PO_4^{3-}) als beste Variante heraus. Im nächsten Schritt wurde jetzt eine GDNT-Variations-Reihe durchgeführt, bei der das gleiche Wasservolumen von 10 mL und je 1 mL GDNT-Lösung zugegeben wurden. Die variierte Größe der Reihe war die zugegebene Calcium- und Phosphatlösungs-Menge, welche mit 0,25 / 0,5 / 0,75 / 1 mL variiert wurde.

Bei der Untersuchung der Partikelgrößen dieser Reihe kann ganz klar belegt werden, dass die Vorlage von 0,25 mL die kleinsten Nanopartikel bildet. Mit steigender Zugabe von GDNT steigt auch die Partikelgröße. In Tabelle 15 werden die Mittelwerte der Partikelmessungen dargestellt. Der Hauptpeak beinhaltet bei der Partikelgrößen-Verteilung den intensiveren Peak, denn manche Messungen wiesen zwei Peaks auf.

Tabelle 15 - GDNT-Reihe mit 10 mL Wasservorlage

GDNT in 10 mL Wasser				
GDNT-Volumen je 1 mL				
Calcium- und Phosphatlösung (pH 8)	PDI	Dauer der Beobachtung	Partikelgröße	Intensitätsverteilung des Hauptsignales
in mL		in Tagen	in nm	in %
0,25	0,236	88	89	91,5
0,5	0,306	88	114	82,5
0,75	0,208	88	175	98
1	0,277	2	238	98

In allen Fällen war der zweite Peak ein Agglomerate-Peak mit Partikeln jenseits der 1000 nm. Alle Messreihen verzeichneten einen Anstieg der Partikelgröße, welcher sich auf die ersten 10 bis 20 Tage beschränkte. Nach 20 Tagen blieb die Größe der Partikel nahezu konstant (Abbildung 4.42).

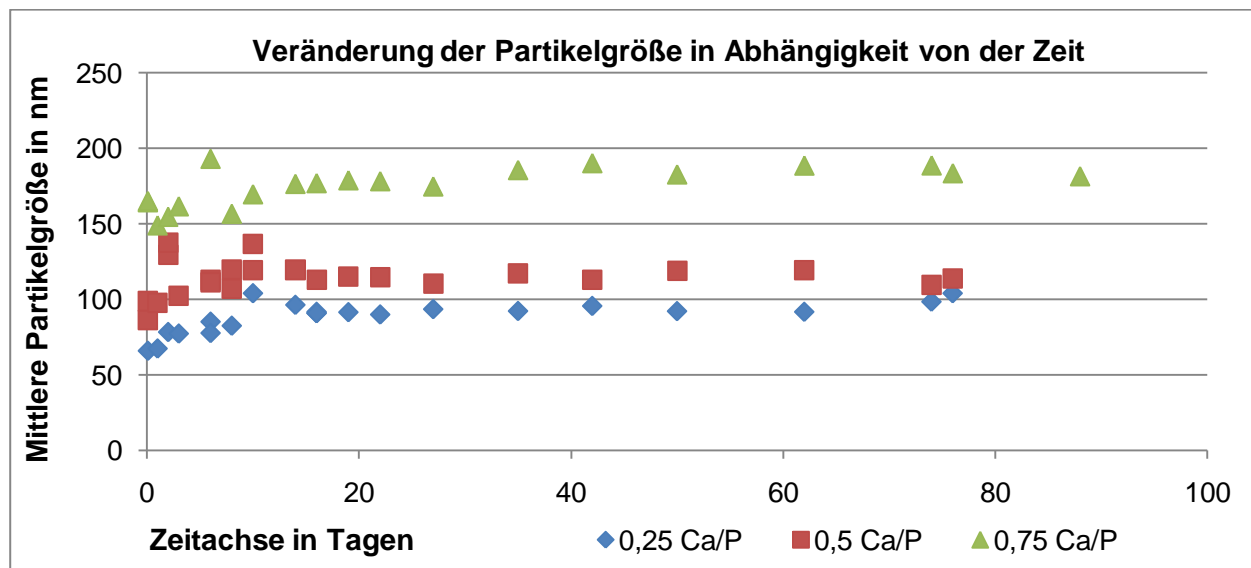


Abbildung 4.42 - Diagramm zur Veränderung der Partikelgrößen: Abhängigkeit der GDNT-Reihe mit 10 mL Wasser von verschiedenen Calcium- und Phosphatlösungszugaben und mit je 1 mL GDNT-Lösung

Insgesamt wurden bei der Reihe mit 10 mL Wasservorlage jeweils 1 mL GDNT-Lösung (1 g L^{-1}) in Ethanol zugegeben (pH-Wert der Vorlage $5,0 \pm 0,1$) und die Zugabe an Calcium- und Phosphatlösung variiert; je 0,25 / 0,5 / 0,75 / 1,0 mL (pH 8 oder 9). Die Probe mit den kleinsten, monodispersen Partikeln (sehr niedriger PDI) war die Reihe mit 10 mL Wasservorlage, 1 mL GDNT-Lösung und 0,25 mL Calcium- und Phosphatlösungen mit pH 8. Hier entstanden laut dynamischer Lichtstreuung Partikel mit einem hydrodynamischen Radius von 70 bis 100 nm und einem PDI zwischen 0,1 und 0,3. Diese Ergebnisse wurden mehrfach erzeugt und können daher als reproduzierbar angesehen werden. Die Untersuchungen der Morphologien und Größen der Partikel im REM stellte sich als problematisch heraus, denn die Proben zeigten selten sphärische Nanopartikel, sehr oft große Kristalle (Calciumphosphat und Natriumchlorid) sowie nicht abbildbare undefinierte Tropfen, die im Elektronenstrahl sehr schnell wegschmolzen und verdampften. Hier lag die Vermutung auf der Hand, dass sich die Lipidfraktion und das Calciumphosphat nicht verbinden konnten. Als Ursache dafür stellte sich heraus, dass das Lipid in Wasser Vesikel oder ähnliche Strukturen bildet. Bei einem Wasservolumen von 10 mL und einer Lipidmasse von 2 mg (entspricht 2 mL) sind die Vesikel 100 bis 300 nm groß (PDI zwischen 0,05 und 0,09). Somit wird es schwierig, Nanopartikel monodispers im Bereich 100 bis 150 nm herzustellen, da die Vesikel alleine schon diese Größe erreichen. Dies bedeutet für die Reaktion zwischen Lipid und Calciumphosphat auch, dass die Ausgangsposition eines Calciumphosphatkerns mit einer Lipidschicht so nicht möglich ist. Sie sollte wie folgt ablaufen: Das Lipid sollte gelöst und nicht agglomeriert in der Lösung vorliegen, so dass die entstehenden Calciumphosphat-Kristallisationskeime sofort umschlossen werden können und keine Anlagerung aneinander erfolgen kann. Liegen die Lipide aber als Vesikel vor, so lagern sich die Kristallisationskeime unter Umständen auf der Vesikeloberfläche an. Dies führt viel leichter zur Agglomeration, da die Keime nicht einfach abgeschirmt werden können, denn die Vesikel sind viel größer als einzelne Lipidmoleküle. Daher bilden die Mizellen keine geschlossene Oberflächenschicht. Die Vesikel könnten eine Überbrückungsflockung auslösen, indem sich mehrere Vesikel an ein Agglomerat aus mehreren Calciumphosphatkeimen anlagern und so sehr große Aggregate bilden. Sie haben außen eine Lipidschicht, an der sich wieder Calciumphosphat anlagern kann. So kann keine Stabilisierung erfolgen und damit auch keine reproduzierbare Größenverteilung der Nanopartikel ermittelt werden.

Die einzige Probe dieser Reihe, die das Bilden von Nanopartikeln im REM zeigt, war der Ansatz mit je 0,75 Calcium und Phosphatlösung Zugabe. Hier bildete sich laut dynamischer Lichtstreuung folgende Größenverteilung (Abb. 4.43):

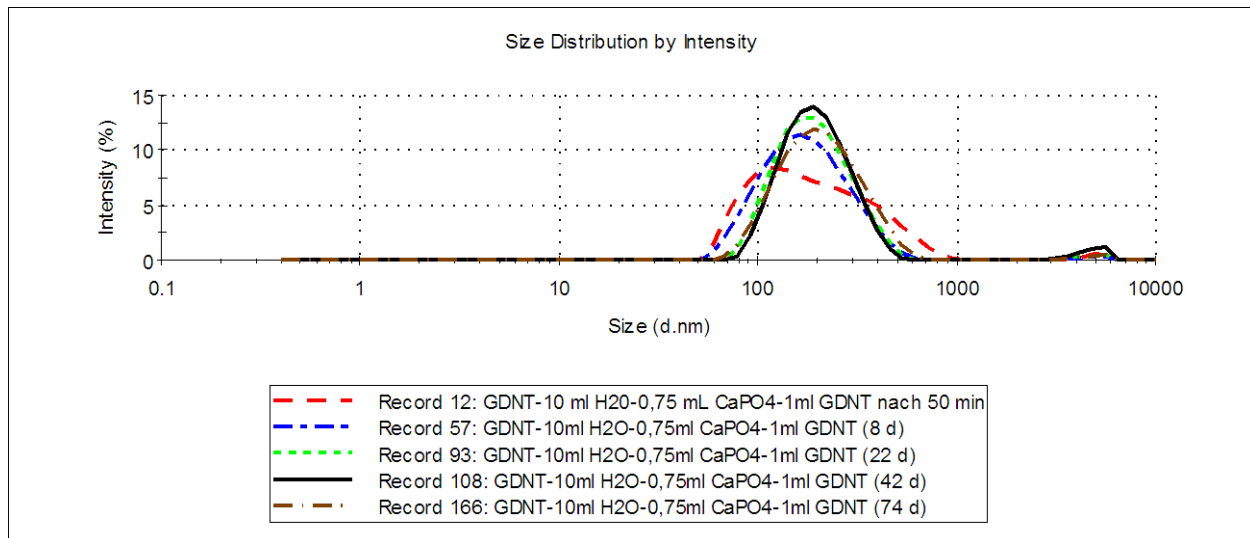


Abbildung 4.43 - Größenverteilung nach der DLS der Reihe 10 mL Wasservorlage, je 0,75 mL Calcium- und Phosphatlösung und 1 mL GDNT-Lösung über einen Zeitraum von ca. 3 Monaten

Die Anwesenheit dieser Partikel konnten im REM auch bestätigt werden. Es gab jedoch auch zahlreiche Agglomerate, Calciumphosphat-, NaCl-Kristalle (nicht gezeigte EDX-Messungen) und viele andere Morphologien, die nicht weiter und genauer untersucht wurden. Das DLS-Diagramm von Abbildung 4.43 zeigt, dass das Maximum des hydrodynamischen Radius im Laufe der Zeit von 120 nm auf rund 200 nm ansteigt.

Abbildung 4.44 zeigt ein REM-Bild dieser Probe. Es zeigt diese Probleme sehr deutlich auf, zeigt aber auch die Anwesenheit von Nanopartikeln. Des Weiteren ist bei der REM-Aufnahme zu beachten, dass das Bild ein Tag nach der Herstellung erstellt wurde. Hier in Abbildung 4.44 sind die Nanopartikel neben großen Kristallen (Calciumphosphat und NaCl) und Lipid-Vesikeln (im obigen REM-Bild nicht zu sehen) sichtbar. Das Verhältnis zwischen Nanopartikeln, kristalliner Verunreinigung und Vesikeln wurde mit steigendem Alter schlechter und die Vesikel übernahmen bei den REM-Bildern die Mehrzahl, konnten aber wie schon beschrieben, nicht abgebildet werden.

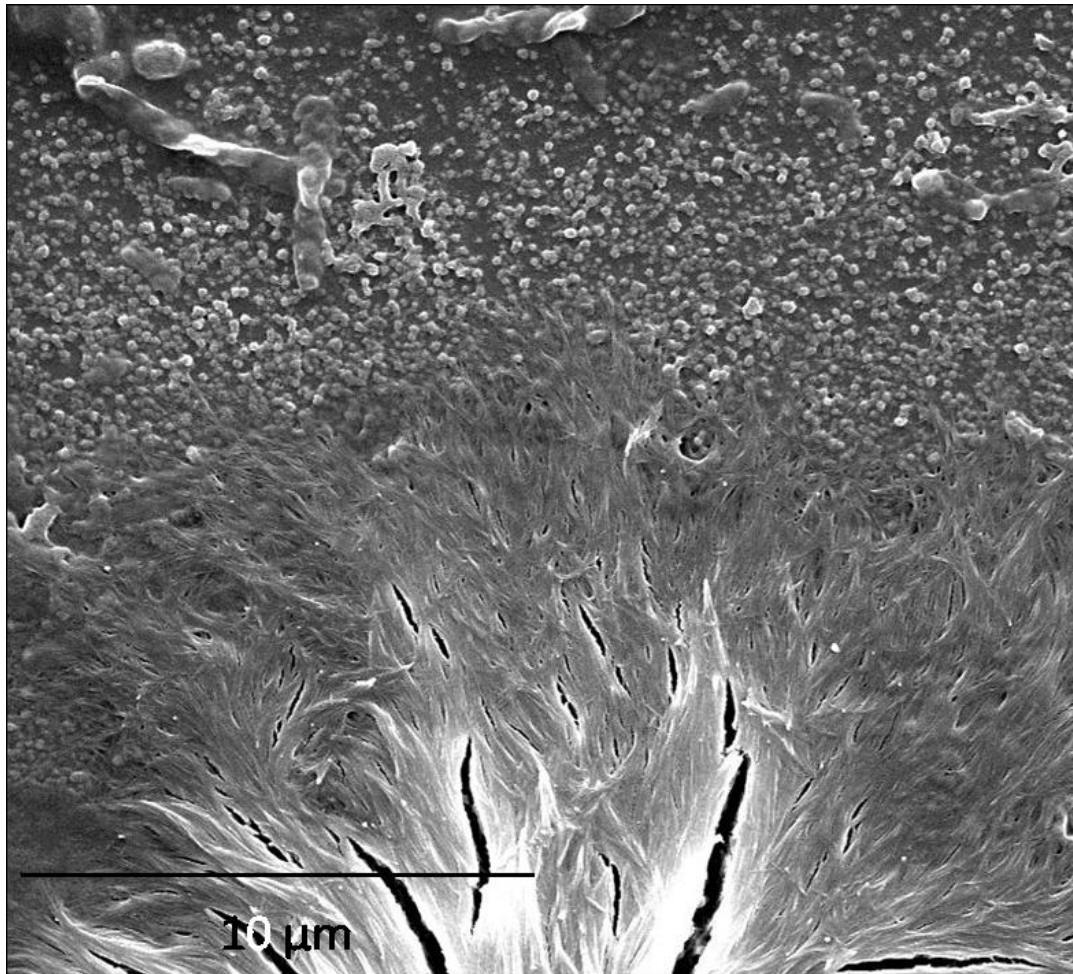


Abbildung 4.44 - 1 mL GDNT in 10 mL H₂O bei einer Zugabe von je 0,75 mL Calcium und Phosphatlösung (eingestellt auf pH 8)

4.4.2 Versuchsreihen mit einem vorgelegten Wasservolumen von 20 mL und 30 mL Wasser

Eine Erhöhung der Verdünnung sollte die vollständige Löslichkeit der geringen Mengen an Lipid ermöglichen und das Problem lösen. Zu diesem Zweck wurde das vorgelegte Volumen auf 20 und 30 mL Wasser erhöht, aber auch dies brachte keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Die Vesikelgröße konnte durch die Vorlage von 20 mL Wasser lediglich auf 50 bis 60 nm reduziert werden. Abbildung 4.45 zeigt das DLS-Ergebnis von fünf identisch angesetzten Proben, welche 20 mL Wasser und 1,0 mL GDNT enthalten und 10 min lang vor der Messung gerührt wurden.

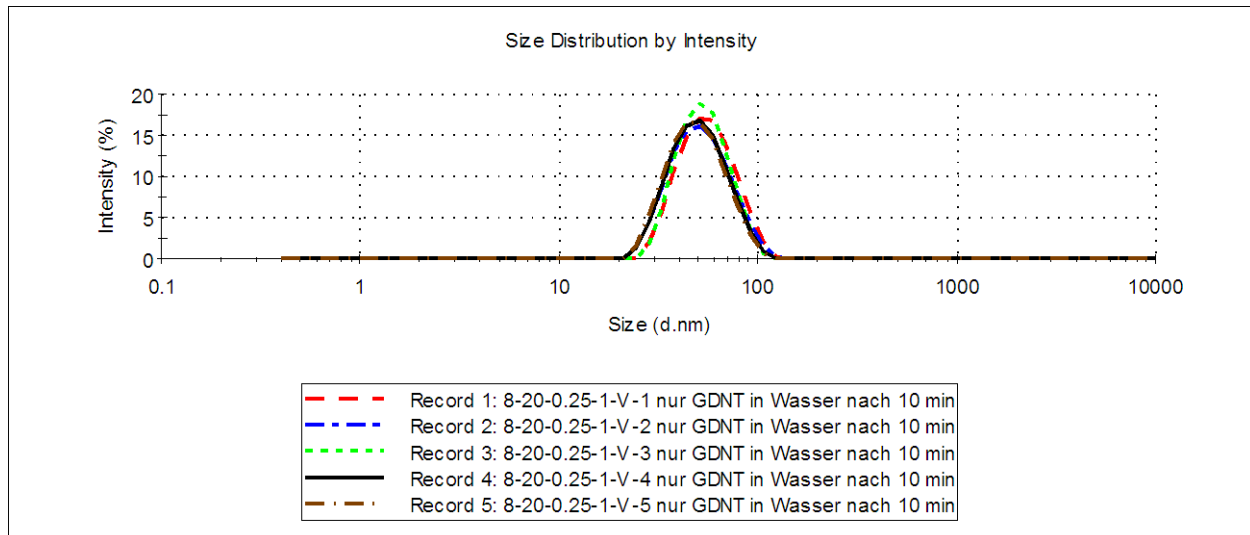


Abbildung 4.45 - Vesikelgröße des GDNT in 20 mL Wasser

Die Zugabe von je 0,25 mL Calcium- und Phosphat-Lösung, welche auf pH 8 eingestellt war, führte in der DLS zu einem zweiten Peak bei ~400 nm neben dem 50 bis 60 nm Peak der Vesikel. In Abbildung 4.46 ist der intensive Peak bei ca. 50 nm deutlich neben einigen Agglomeraten verschiedener Größe zu sehen. Da der PDI zwischen 0,25 und 0,4 liegt sind die Zahlenwerte der Messung aber nicht als genau zu betrachten.

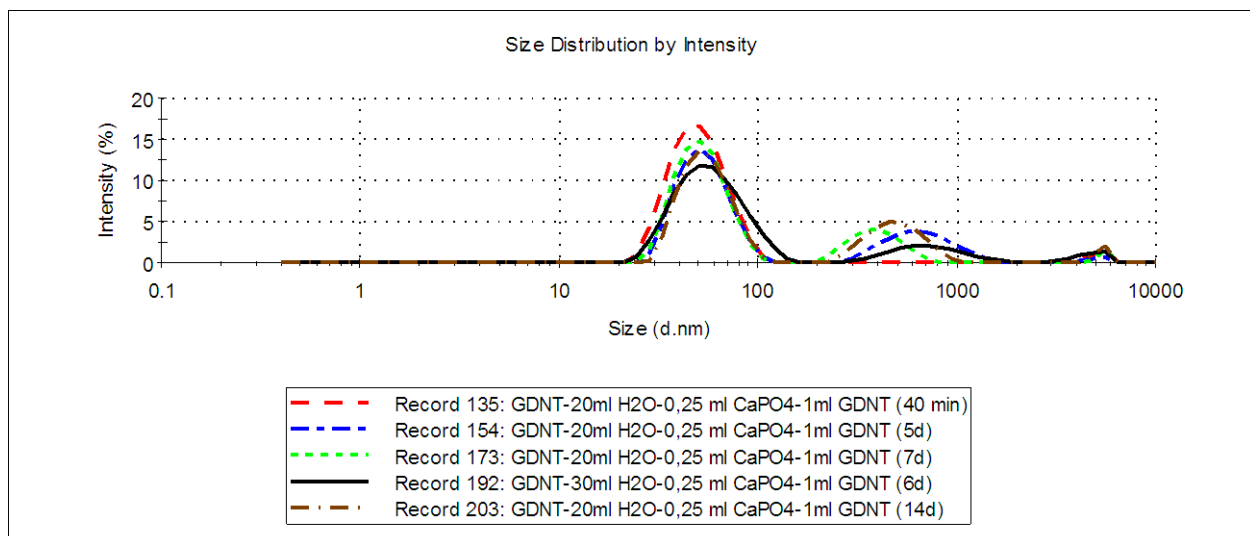


Abbildung 4.46 - Größenverteilung einer Probe mit 20 mL Wasser und der Zugabe von je 0,25 mL Calcium- und Phosphatlösung

Die Ergebnisse sind für die 30 mL-Wasservorlage-Reihen nahezu identisch. Bei einer Erhöhung der zugegebenen Volumen an Calcium- und Phosphatlösung kam es nach sehr kurzer Zeit zur Ausbildung von Agglomeraten, die einen Niederschlag bildeten. Nur die Calcium- und Phosphatlösungs-Volumina 0,25 (20 und 30 mL Wasservorlage) und 0,5 mL (30 mL Wasservorlage) bildeten keine Niederschläge.

Hier stellte sich bei länger Betrachtung der Partikel auch heraus, dass die 60 nm Partikel abgebaut werden und größere Partikel entstehen. Filtrationsversuche konnten erfolgreich die Agglomerate entfernen, jedoch konnten dann im REM auch keinerlei Nanopartikel mehr gefunden werden. Die Proben bestanden nahezu nur aus den tropfenartigen Strukturen, die im Elektronenstrahl innerhalb von Sekunden verschwanden. Daher existieren von diesen filtrierte Proben auch keine repräsentativen REM-Aufnahmen. Als letzter Versuch dieser Reihe wurden parallel zueinander fünf identische Ansätze der Probe 20 mL Wasser, je 0,25 mL Calcium- und Phosphatlösung und 1 mL GDNT-Lösung zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse angesetzt.

Es wäre möglich gewesen, dass der Vesikelpeak nach der Zugabe der Calcium- und Phosphatlösung und der Ausbildung der Nanopartikel in sehr ähnlicher Größenverteilung vorliegt, und in der DLS nicht unterschieden werden kann. Die Signalbreite des Vesikelpeaks und die Intensität hätten sich aber ändern müssen, wenn Vesikel für die Nanopartikelherstellung verbraucht werden. Da sich das Signal nicht verbreiterte wurde davon ausgegangen, dass keine Nanopartikel synthetisiert wurden. Diese sollten auch größer sein als die Vesikel des Lipides. Nachdem die Probe zentrifugiert und am REM beobachtet wurde, stellte sich heraus, dass die Agglomerate, ähnlich wie beim Filtrieren, abgetrennt wurden und in der Lösung die Lipidvesikel zurück blieben. Alle Nanopartikel waren demnach größer als 0,28 μm , da ein Filter mit dieser Porendurchlässigkeit verwendet wurde. Nur noch Vesikel konnten in der DLS und dem REM nachgewiesen werden.

4.4.3 Reihe mit sehr starker Lipidverdünnung vor der Zugabe der auf pH 8 eingestellten Calcium- und Phosphatlösungen

Die neue Reihe wurde mit 20 mL Wasservorlage und der Zugabe von 0,1 / 0,2 / 0,3 / 0,4 / 0,5 / 0,6 / 0,7 / 0,8 / 0,9 / 1,0 mL Lipid (in Ethanol gelöst, 1 g L⁻¹) begonnen. Diese Blindprobenreihe ohne Calcium und Phosphatzugabe zeigte, dass 0,6 mL GDNT nötig sind, um in wässriger Lösung eine stabile Vesikel Bildung zu ermöglichen, denn diese Proben zeigten nach 20 h noch immer nahezu dieselbe Verteilung wie direkt nach dem 30 min Rühren. Die Proben mit weniger Lipid zeigten eine starke Zunahme im Maximum der Größenverteilung mit teilweise mehreren Peaks. Es wäre möglich, im Bereich der nichtstabilen Vesikel stabilisierte Nanopartikel herzustellen, denn das Lipid scheint bei 0,1 bis 0,5 mL keine stabilen Vesikel zu bilden.

Daher wurde wie immer das Wasservolumen mit Lipid vorgelegt, je 0,25 mL der auf pH 8 eingestellten Calcium- und Phosphatlösungen zugetropft, und 30 min gerührt. Es kam aber bei allen Proben zu ähnlichen Ergebnissen. Der Unterschied zwischen den Proben bestand nur darin, dass die DLS-Messungen der Proben mit wenig Lipid nach der Calcium- und Phosphatzugabe keinen oder nur einen sehr schwachen Peak in der Größenverteilung, vermutlich durch die Vesikel verursacht, zeigten. REM-Aufnahmen von Proben dieser Reihe sahen aus wie Blindproben, also Calciumphosphat ohne Lipid. Parallel erfolgte auch eine Messreihe mit auf pH 9 eingestellten Calcium- und Phosphatlösungen (Kapitel 4.4.4). Die verschiedenen Lipidvolumen haben nach der Zugabe von 0,25 mL Calcium- und Phosphatlösung keinen signifikanten Einfluss auf die Größenverteilung, was dafür spricht, dass alle Proben das Calciumphosphat noch in Lösung halten können. Nach 4 Tagen zeigte die DLS für die Proben mit 0,1 bis 0,3 mL Lipid die Bildung von Agglomeraten. Da der PDI auf über 0,5 anstieg, kann die Aussagekraft der Messung jedoch nur als gering angesehen werden. Andererseits liegt eine Erklärung auf der Hand, denn die zugegebene Calciumphosphatmenge benötigt für eine Stabilisierung eine bestimmte Menge Lipid. Ist diese zu niedrig, so agglomerieren die Partikel auf jeden Fall, auch wenn die Lipide als einzelne Moleküle vorliegen.

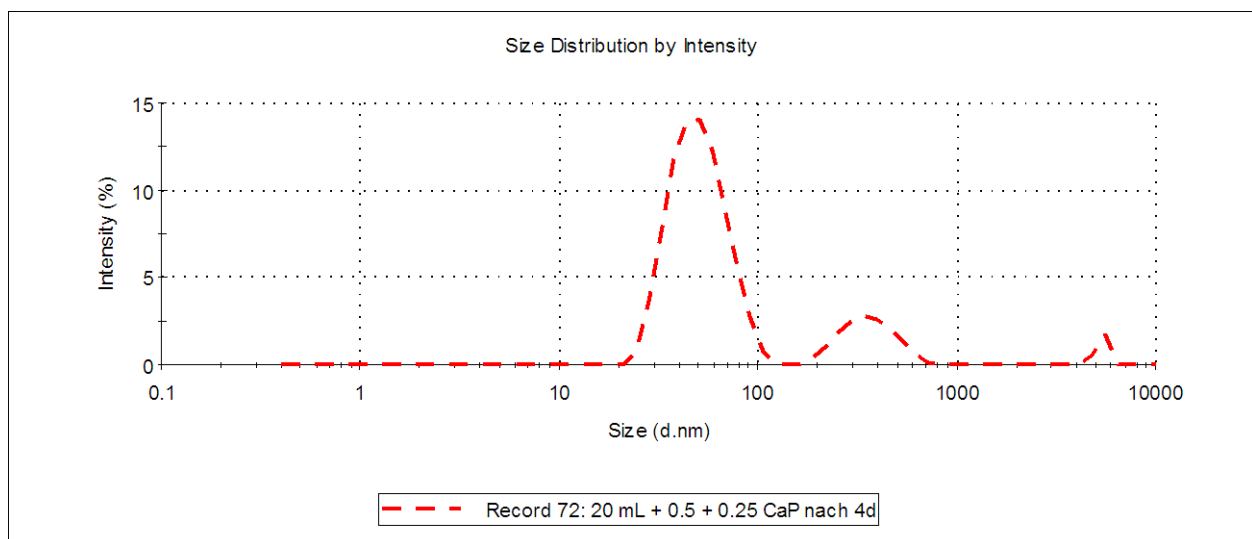


Abbildung 4.47 - Repräsentative DLS-Messung der Messreihe mit verdünnter Vorlage der Lipidlösung

Die Proben mit den niedrigen Lipidvolumen zeigten zwar die Ausbildung von 200 bis 300 nm Partikeln, jedoch setzte sehr schnell die Destabilisierung ein. Die Reihe wurde fortgeführt mit einer erneuten Zugabe von 0,25 mL Calcium- und Phosphatlösung, was

ähnliche Größenverteilungen ergab wie in den vorher durchgeführten Reihen mit 10 bis 30 mL Wasser und 1 mL GDNT. Die Proben zeigten ein einheitliches Bild: Es bildet sich ein primärer Peak bei 50 bis 70 nm und ein zweiter und teilweise auch dritter Peak, der die Anwesenheit von unverbrauchten Vesikeln und gebildeten Agglomeraten belegt. Abbildung 4.47 zeigt exemplarisch eine Probe mit 0,5 mL Lipid und 0,25 mL Calcium- und Phosphatlösungszugabe.

Die Proben zeigten alle bei REM-Untersuchungen die Anwesenheit von kleinen sphärischen Nanopartikeln. Abbildung 4.48 gibt stellvertretend für die anderen Proben der Reihe die Morphologie der Partikel wieder. Das REM-Bild zeigt stark verwachsene und je nach Probe ca. 100-500 nm große Nanopartikel. In diesem Zusammenhang wurde die gesamte Reihe der Proben nach der zweiten Calcium- und Phosphatlösungszugabe zentrifugiert, was die Nanopartikel aber zerstörte. Die REM-Proben nach der Ultrazentrifugation zeigten kristalline Morphologien von Calciumphosphat ähnlich denen der Blindproben. Es sind auch Lipidtropfen zu sehen, die im Elektronenstrahl schnell wegschmolzen.

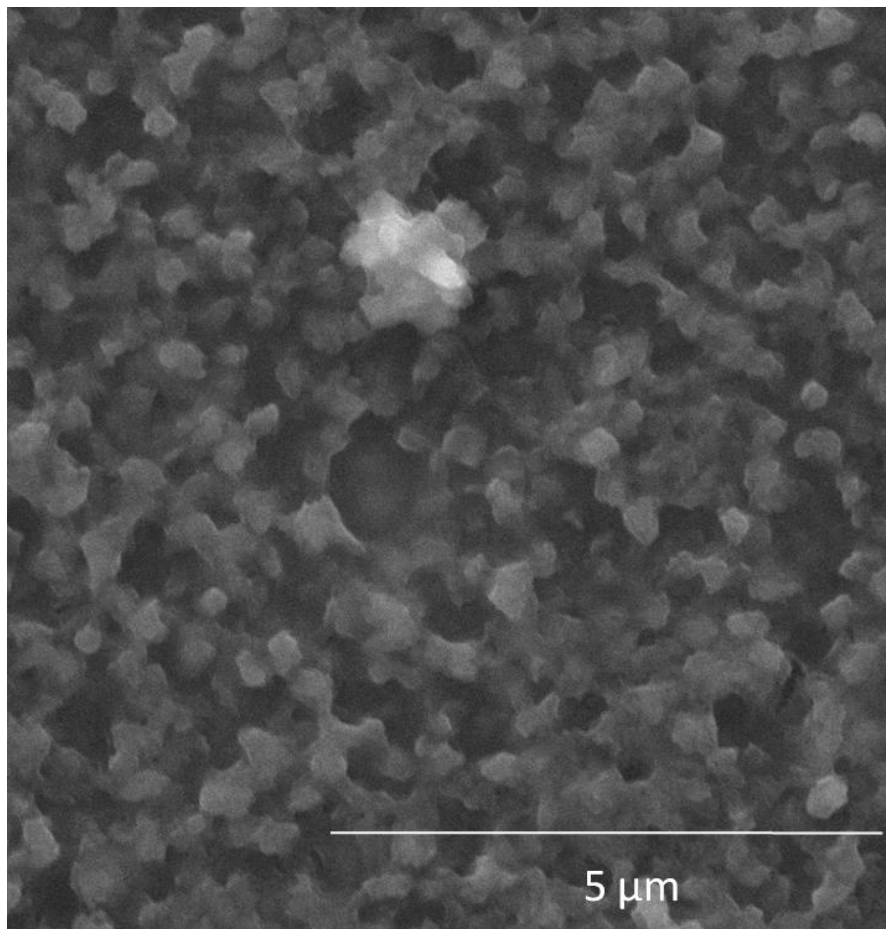


Abbildung 4.48 - Nanopartikel der GDNT-Reihe mit stark verdünnter GDNT-Vorlage vor der Reinigung durch Ultrazentrifugation

Die Lösung über dem Niederschlag zeigte nur ein paar vereinzelte würfelförmige Kristalle, die auf die Anwesenheit von NaCl zurückzuführen sind. Diese Ergebnisse belegen, dass nur eine unzureichende Stabilisierung erfolgt ist.

Diese Reihe wurde wegen der Anwesenheit der Nanopartikel (Abbildung 4.48) auf Reproduzierbarkeit überprüft. Es gelang zwar mehrfach, die Partikel erneut herzustellen, jedoch nicht, sie zu isolieren. Weder eine Ultra- noch eine normale Zentrifugation führte zu isolierten Nanopartikeln, sondern die Partikel wurden entweder nicht abzentrifugiert oder zerstört. Die Bedingungen der Zentrifugation wurden zwischen 10.000 und 40.000 Umdrehungen pro Minute für 30 min variiert.

4.4.4 Reihe mit sehr starker Lipidverdünnung vor der Zugabe der auf pH 9 eingestellten Calcium- und Phosphatlösungen

Bei einem pH von 8 konnte keine ausreichende Stabilisierung der Calciumphosphat Nanopartikel erreicht werden. Hier sollte daher untersucht werden, ob die bei pH 9 schneller ablaufende Bildung des Calciumphosphates die Stabilisierung der Nanopartikel positiv beeinflusst. Die Experimente wurden genau wie in der Standardfällung beschrieben durchgeführt (Kapitel 4.1.1).

4.4.4.1 Versuchsreihen mit Proben, die mit 10 mL Wasservorlage, 0,25 mL Calcium- und Phosphatlösung auf pH 9 eingestellt und GDNT-Lösung dargestellt wurden

Die nachfolgende Tabelle 16 fasst die durchgeführten Experimente zusammen. Es wurden 10 mL Wasser, je 0,1 / 0,2 / 0,3 / 0,4 / 0,5 / 0,6 / 0,7 / 0,8 / 0,9 / 1,0 mL Lipid (in Ethanol gelöst, 1 g L^{-1}) vorgelegt und 0,25 mL Calcium- und Phosphatlösung auf pH 9 eingestellt zugegeben.

Aus der Tabelle 16 wird ersichtlich, dass keine der angesetzten Proben monodisperse Partikel bildet. Die Größe der Partikel sieht auf den ersten Blick mit 200 bis 300 nm relativ monodispers aus, aber der PDI liegt in allen Proben über 0,3. Dies bedeutet, dass die Partikel nicht mehr monodispers sind. Die Primärpeakfläche liegt bei fast allen Proben bei 75 bis 90 %. Es sind also zwischen 10 und 25 % Agglomerate zugegen. Außerdem sind die Stabilitäten der Proben sehr unterschiedlich und zeigen keinen deutlichen Trend.

Tabelle 16 - DLS-Untersuchungen der Proben mit 10 mL Wasservorlage, 0,25 mL Calcium- und Phosphatlösung auf pH 9 eingestellt und GDNT Lösung

DLS Untersuchungen der Proben 10 mL Wasservorlage, 0,25 mL Calcium- und Phosphatlösung (pH 9) und GDNT-Lösung					
GDNT-Zugabe	Beobachtungszeitraum	PDI	Mittelwert der Größe	Peakfläche des Hauptpeak	Bemerkung
mL	h	Mittelwert	nm	% der Intensität	
0,1	45	0,368	275	79	nicht zentrifugiert, starke Flockung nach 45 h
0,2	45	0,371	238	75	
0,3	24	0,420	236	87	nicht zentrifugiert, starke Flockung nach 24 h
0,4	24	0,542	272	82	
0,5	626	0,461	263	78	
0,6	626	0,398	249	87	nicht zentrifugiert, Trübung
0,6	608	0,454	205	74	zentrifugiert, nach 608 h begann die Ausbildung von Agglomeraten
0,7	24	0,330	213	99	nicht zentrifugiert, starke Flockung nach 24 h
0,8	1295	0,411	230	87	nicht zentrifugiert, Trübung
0,8	608	0,313	151	96	zentrifugiert, nach 608 h begann die Ausbildung von Agglomeraten
0,9	1295	0,367	448	90	nicht zentrifugiert, Trübung
0,9	1231	0,401		91	zentrifugiert
1,0	452	0,409	276	87	nicht zentrifugiert, Trübung
1,0	822	0,339	208	90	zentrifugiert, nach 608 h begann die Ausbildung von Agglomeraten

Die Proben lassen sich in drei Typen der Stabilisierungsqualität einteilen. Zum ersten Typ gehören die Proben mit 0,1 bis 0,4 und 0,7 mL GDNT-Lösungszugabe, welche innerhalb der ersten 25 bzw. 45 h sedimentierten. Der zweite Typ zeigt Partikel mittlerer Stabilität (bis zu 822 h). Hierzu zählen die Proben mit 0,5 / 0,6 / 0,8 zentrifugiert / 1,0 mL GDNT-Lösungszugabe. Hier kam es zu einer massiven Sedimentation zwischen 452 und 822 h. Die Proben des dritten Typs zeigten innerhalb

von 1300 h keine Sedimentation. Hierzu zählen die nicht zentrifugierte Probe mit 0,8 mL GDNT, sowie die Probe mit 0,9 mL GDNT (zentrifugiert und nicht zentrifugiert). Die dynamischen Lichtstreuungsuntersuchungen des ersten Typs ergaben Messungen mit niedriger Qualität, so dass sie nicht auswertbar waren. Typ 2 zeigte in der dynamischen Lichtstreuung keine einheitliche Größenverteilung, diese Proben führten auch innerhalb von 26 Tagen nicht zu einer einsetzenden Sedimentation (Abbildung 4.49). Die Probe mit 0,5 mL der GDNT-Lösung steht hier stellvertretend für den Typ 2.

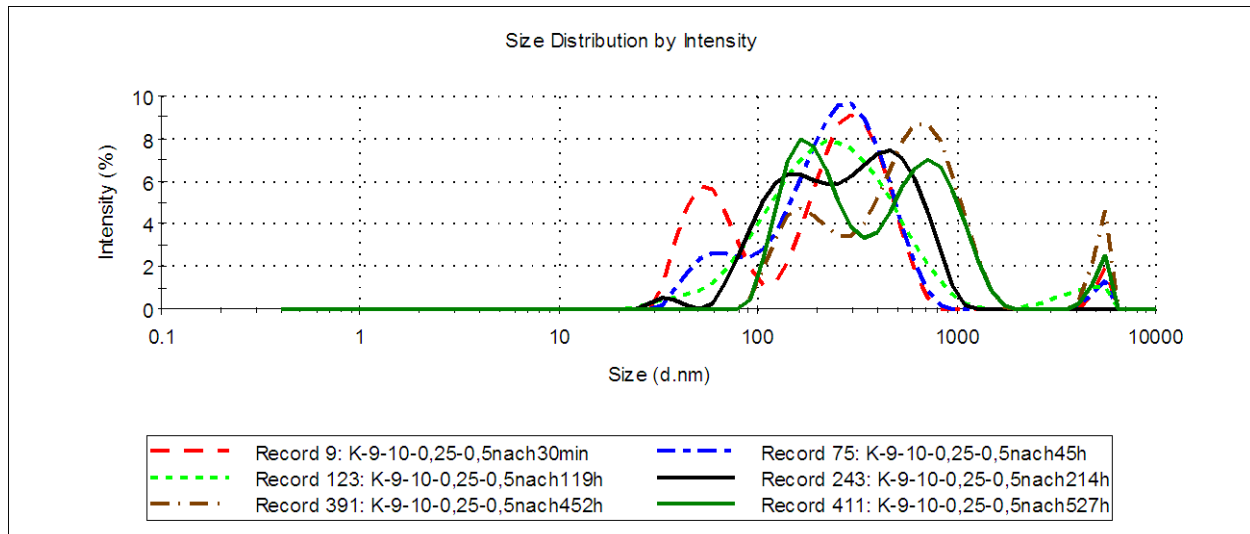


Abbildung 4.49 - DLS-Diagramm zur Messreihe 10 mL Wasser, 0,25 mL GDNT, Calcium- und Phosphatlösung auf pH 9 eingestellt, Typ 2

Es sind in nahezu allen Messungen Agglomerate vorhanden, genauso wie Vesikel des Lipides (Peak unter 100 nm). Ein Trend ist nur abzuschätzen, insgesamt sinkt die Genauigkeit der Messung mit zunehmendem Alter, denn der PDI wird höher, die Partikelverteilung breiter, das Maximum der Größenverteilung steigt. Die jüngeren Kurven in Abbildung 4.49 (Record 9, 75 und 123) zeigen einen abnehmenden Vesikelpeak bei 50 nm und einen steigenden ~200 nm Peak. Die später gemessenen Kurven (Record 243, 391 und 411) zeigen eine Zunahme der Größe von 200 nm, unter Abnahme der Intensität des Signales, nach über 800 nm. Gleichzeitig nimmt die Intensität des Agglomeratpeaks bei 5,5 μm zu.

Typ 3 (Abbildung 4.50) zeigt in der dynamischen Lichtstreuung eine wesentlich einheitlichere Partikelgrößenverteilung. Insgesamt sind die Vesikel nach 30 min nicht mehr zu messen, der Hauptintensitätspeak liegt jedoch bei ~700 nm.

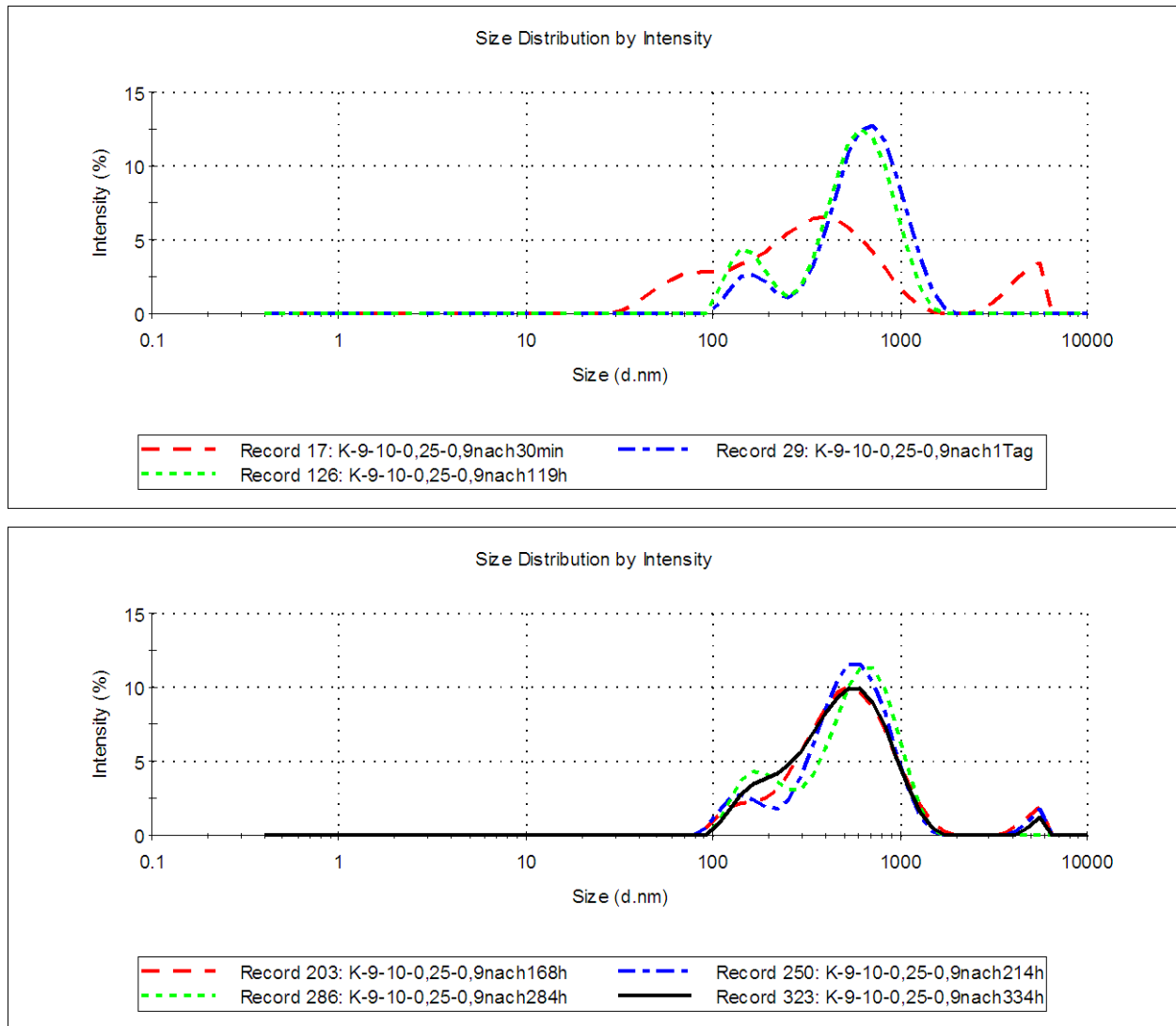


Abbildung 4.50 - DLS-Diagramm zur Messreihe 10 mL Wasser, 0,25 mL Calcium- und Phosphatlösung (pH 9), 0,9 mL GDNT-Lösung, Typ 3 - unzentrifugiert

Der Peak mit einem Maximum ~150 nm ist bei allen Messungen sehr schwach. Die Probe mit 0,9 mL GDNT-Lösung steht hier stellvertretend für den Typ 3. Das Zentrifugieren konnte die Agglomerate offensichtlich gut entfernen, so dass relativ kleine Partikel in den Überständen zurückblieben. Abbildung 4.51 zeigt, dass das Intensitätsmaximum der Größenverteilung von ~700 nm auf ca. 50 % reduziert wurde, aber ein Agglomeratpeak bei mehreren μm bleibt vorhanden.

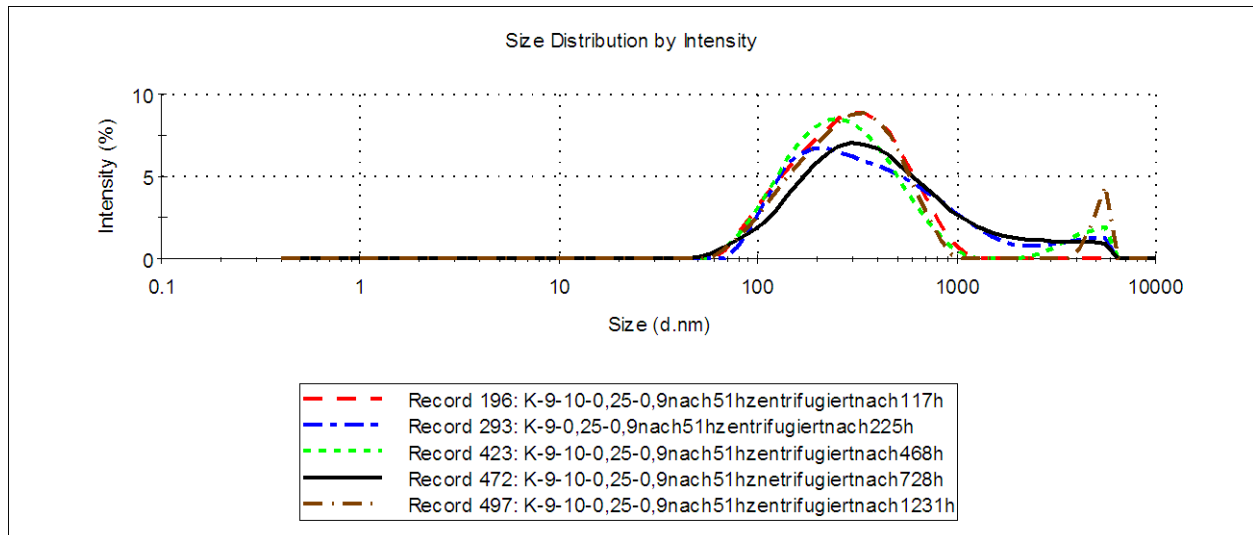


Abbildung 4.51 - DLS-Diagramm zur Messreihe 10 mL Wasser, 0,25 mL Calcium- und Phosphatlösung (pH 9), 0,9 mL GDNT-Lösung, Typ 3 - zentrifugiert

Diese Experimente wurden auch am REM verfolgt. Hier zeigte sich, dass die Ergebnisse der oben gezeigten DLS-Messungen realistisch sind. Die nicht zentrifugierte Probe zeigt Partikel, die über 700 nm groß sind. Die gereinigte Probe hingegen zeigt im Niederschlag Agglomerate und verschiedene Kristalle, aber keine Nanopartikel. Im Zentrifugat hingegen finden sich verwachsene, nicht ganz sphärische und ~100 nm große Partikel wieder. Abbildung 4.52 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Reihen: Links: 0,8 mL GDNT ohne Reinigung; Rechts: Probe mit 0,6 mL GDNT-Zugabe nach Zentrifugation

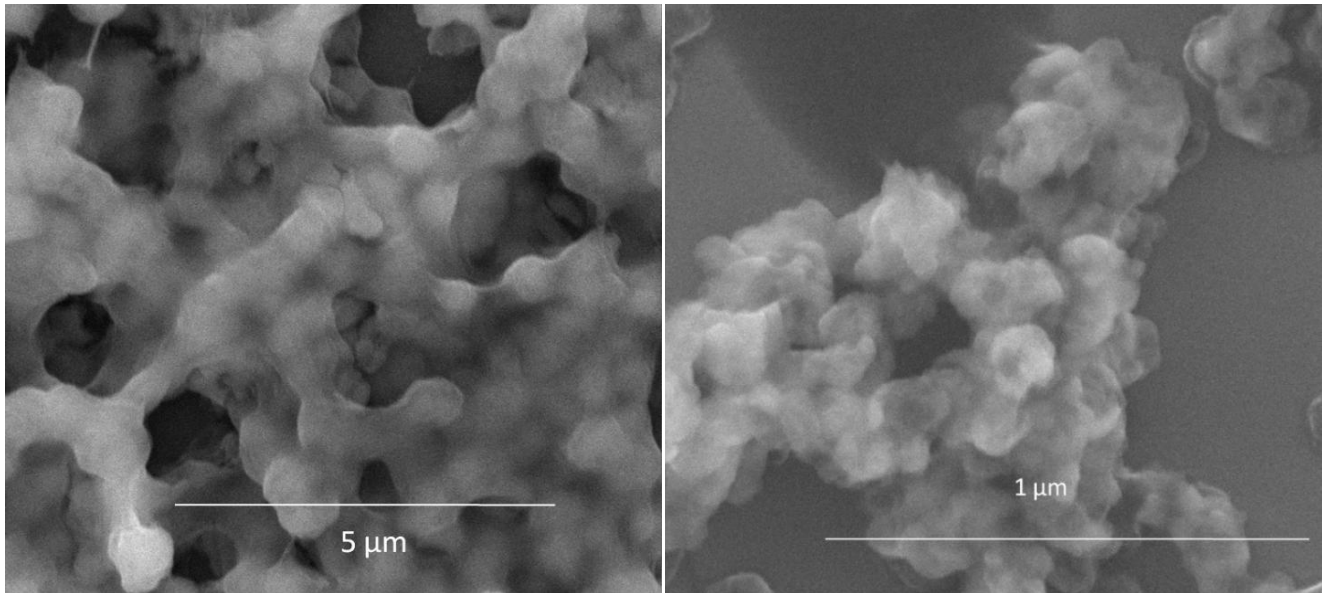


Abbildung 4.52 - REM-Aufnahme der Probe mit 10 mL Wasservorlage und 0,25 mL Calcium- und Phosphatlösung (pH 9).

4.4.4.2 Versuchsreihen mit Proben, die mit 20 mL Wasservorlage, 0,25 mL Calcium und Phosphatlösung auf pH 9 eingestellt und GDNT-Lösung dargestellt wurden

Aufgrund des Vorkommens der Nanopartikel mit zahlreichen Agglomeraten wurde hier das vorgelegte Wasservolumen erhöht, um zu überprüfen, ob der Verdünnungseffekt die Stabilisierung der Nanopartikel verbessert und dann monodisperse stabile Partikel entstehen. Es wurden wie in der Reihe vorher das Wasser, je 0,1 / 0,2 / 0,3 / 0,4 / 0,5 / 0,6 / 0,7 / 0,8 / 0,9 / 1,0 mL Lipid (in Ethanol gelöst, 1 g L^{-1}) vorgelegt und 0,25 mL Calcium- und Phosphatlösung (auf pH 9 eingestellt) zugegeben. Im weiteren Verlauf der Experimente wurden zu den 0,25 mL Calcium- und Phosphatlösung weitere 0,25 mL gegeben, um den direkten Einfluss zu beobachten. Die Experimente führten nicht zu stabilen Dispersionen. Bei den niedrigen GDNT-Volumina verlief das Wachstum der Calciumphosphat Agglomerate schneller und vollständiger. Es wurden alle Vesikel sehr schnell (innerhalb von 115 h) zu Agglomeraten aus Calciumphosphat und Lipid umgesetzt. Eine erneute Zugabe von Calcium- und Phosphatlösung führte bei den Proben mit mehr als 0,5 mL GDNT zu einem weiteren Abbau der Vesikel zu Gunsten von mehr Agglomeraten. Die Abbildungen 4.53 und 4.54 zeigen dies in drei Diagrammen: In Abbildung 4.53 zeigt sich, dass noch ein relativ hoher Anteil an Vesikeln des Lipides oder kleinen Nanopartikeln, die nicht stabil sind, vorhanden ist. Die Intensität des Peaks fällt von 15 % auf ca. 8 % ab, aber dieser Peak ändert sich in den folgenden zwei Abbildungen nicht mehr wesentlich. Die in Abbildung 4.53 dargestellten

Kurven stehen für die Messung, welche nach der zweiten Zugabe und dem anschließenden 30 min Rühren durchgeführt wurde.

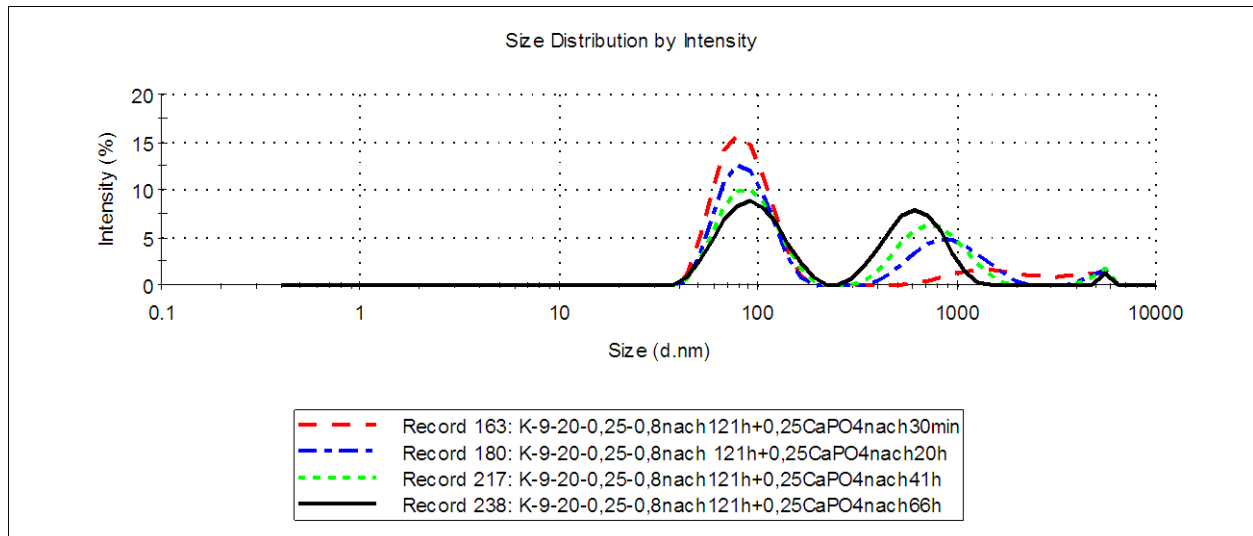


Abbildung 4.53 - Darstellung des Vesikelabbaues: 20 mL Wasservorlage mit 0,8 mL GDNT, 0,25 mL + 0,25 mL Calcium- und Phosphatlösung (pH 9).

Abbildung 4.53 zeigt ebenfalls das Ausbilden der Agglomerate. Die Reaktion lief über mehrere Tage ab, ist folglich keine schnell ablaufende Reaktion. Die rote Kurve (Record 163) zeigt nahezu nur Vesikel. Der Peak bei 600 nm nimmt im Laufe der Zeit (Record 180, 217, 238) an Intensität zu und steigt von 2 % auf 8 %. Die Intensität des Vesikelpeaks nimmt hingegen von 15 % auf ebenfalls 8 % ab. In der schwarzen Kurve (Record 238) liegen Vesikel und Nanopartikel-Intensität und Intensität der Agglomerate nahezu im Verhältnis 1:1 vor. Dies ändert sich langsam in Abbildung 4.54 (oben), denn diese Diagramme belegen, dass sich die kleinen Nanopartikel zu mehreren hundert nm großen Agglomeraten zusammenlagern. Abbildung 4.54 (oben) zeigt das Zeitfenster von 137 h bis 304 h nach der Zugabe, das untere Diagramm zeigt das Zeitfenster von 379 h bis 538 h nach Zugabe.

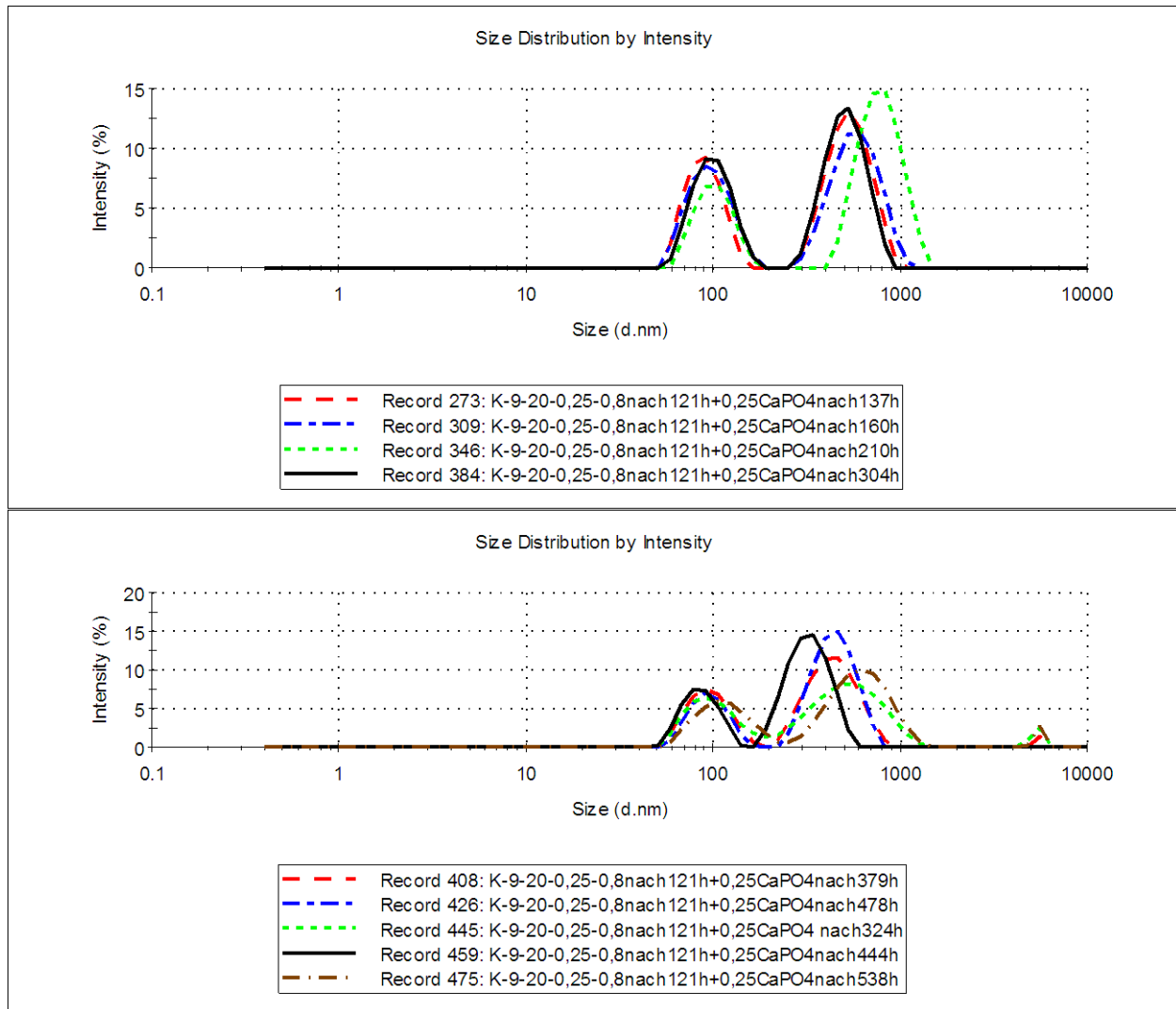


Abbildung 4.54 - Darstellung des Vesikelabbaues: 20 mL Wasservorlage mit 0,8 mL GDNT, 0,25 mL + 0,25 mL Calcium- und Phosphatlösung (pH 9)

Es sind immer noch Vesikel vorhanden und eventuell eine kleine Menge an kleinen Nanopartikeln. Die Intensitätsverteilung für den Vesikelpick sinkt in den nächsten Tagen von 8 % auf 6 % ab, wohingegen der Agglomeratpeak an Intensität zunimmt. Die Größenverteilung wird langsam auch breiter, was im unteren Diagramm von Abbildung 4.54 sichtbar ist. Nach über 14 Tagen bildet sich ein Peak bei 5,5 μm aus, der die einsetzende Sedimentation bestätigt.

Zur zusätzlichen Auswertung wurden von den Proben mit 0,8 / 0,9 und 1,0 mL GDNT Zugabe REM-Untersuchungen durchgeführt. Abbildung 4.55 zeigt eine REM-Aufnahme der Nanopartikel der Probe mit 0,8 mL GDNT. Die Probe mit 0,9 und 1,0 mL GDNT war wesentlich stärker vernetzt, Nanopartikel sind nur noch schlecht sichtbar, da alles unter einem Film liegt, der die Konturen der Partikel verschwimmen lässt. Daher ist das Bild relativ unscharf. Abbildung 4.55 zeigt die Anwesenheit von Nanopartikeln, die zwischen

200 und 300 nm groß und stark verwachsen sind. Die massive Anwesenheit von Kristallen und Agglomeraten soll nicht verschwiegen werden. Auf eine Darstellung derselben soll im folgenden REM-Bild aber verzichtet werden. Die dynamischen Lichtstreuungsmessungen sind laut REM-Bildern trotz des schlechten PDIs korrekt. Insgesamt konnte die Zugabe des Calciumphosphates (bei pH 9) immer noch nicht zu stabilen Nanopartikeln führen.

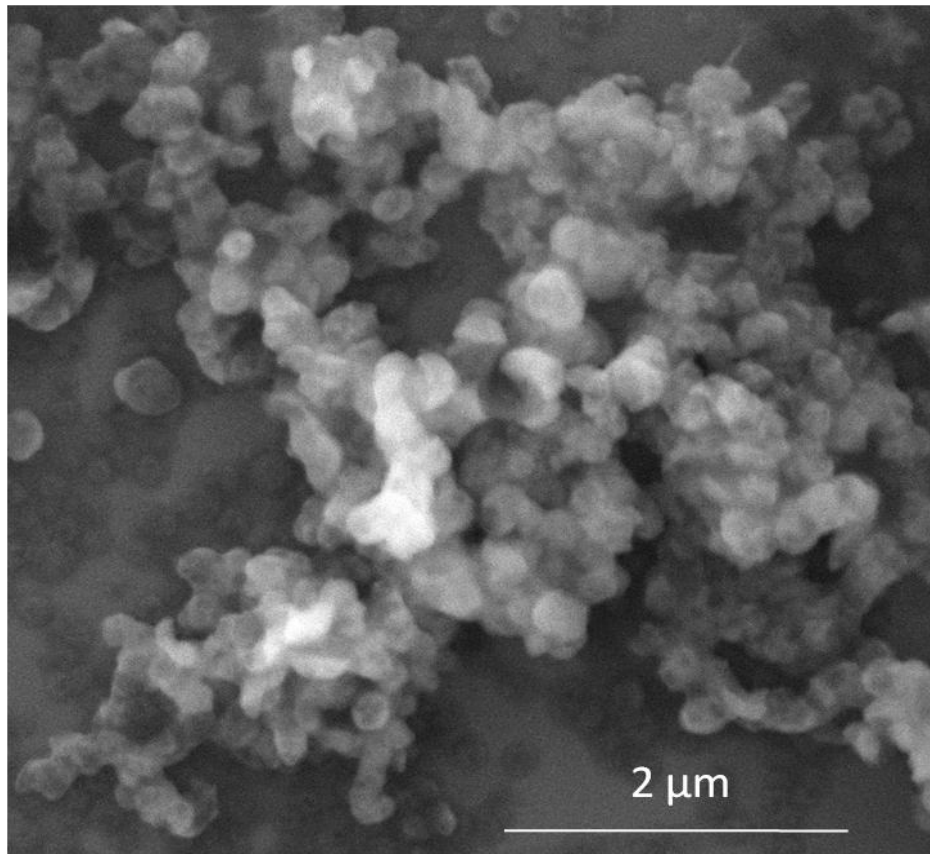


Abbildung 4.55 - REM-Aufnahme einer Probe mit 20 mL Wasser- und 0,8 mL GDNT-Vorlage, 0,5 mL Calcium- und Phosphatlösungszugabe (pH 9), ohne Reinigung

4.4.5 Zusammenfassung der GDNT-Reihen mit verschiedenen vorgelegten Wasservolumina, Calcium- und Phosphatlösungsmengen und pH Werten sowie variierten GDNT-Zugabemengen

Es hat sich herausgestellt, dass die Löslichkeit des GDNT trotz der polaren Enden so gering ist, dass das Lipid in Wasser Vesikel bildet. Diese haben eine massive Agglomeration zur Folge. Die Agglomeration des Calciumphosphates mit dem Lipid ist reproduzierbar, aber die Größe der Partikel nicht. Die pH-Werte der Calcium- und Phosphatlösungen haben keinen signifikanten Einfluss auf die Stabilität. Die

Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde daher nur für die Reihe mit pH 8 getestet, jedoch kamen bei identischen Ansätzen unterschiedliche dynamische Größenverteilungen heraus, obwohl der PDI mit unter 0,1 sehr gut ist. Danach erübrigte sich der Versuch, die pH 9 Reihen zu reproduzieren, die viel schlechtere PDIs ergab und einen eindeutigen Trend zu nicht ausreichender Stabilisierung hat. Ursache für diese Ergebnisse ist, dass sich nicht wie gewünscht, ein Kristallisationskeim aus Calciumphosphat bildet. Hier würde idealerweise der Kern von den einzelnen Lipidmolekülen umschlossen und somit bei optimalen Bedingungen das Wachstum verhindert. Aber da sich die Lipidvesikel erst bilden, lagern sich die Kristallisationskeime auf der Oberfläche an. Dadurch wird die Anlagerung von anderen Lipidvesikeln ermöglicht. Interessanterweise läuft dieser Prozess nicht immer so lange ab, bis sich ein Niederschlag bildet.

Jedoch wie oben schon mehrfach erwähnt, sind die Werte der Größenverteilungen reproduzierbar nicht einheitlich, also ist die Anlagerung des Calciumphosphates an den Lipidvesikel nicht immer gleich stark ausgebildet. Die verschiedenen pH-Werte der Calcium- und Phosphatlösungen ergaben keinen signifikanten Unterschied. Über Blindproben wurde belegt, dass der höhere pH Wert eine schnellere Fällung des Calciumphosphates bewirkt, was keinen Vorteil für die Nanopartikelstabilisierung darstellt, denn die kleinen Kristallisationskeime agglomerieren deutlich schneller. Daher wurde keine Calcium- und Phosphatlösung mehr mit pH 9 verwendet. Die Idee, das vorgelegte Wasservolumen zu erhöhen und so von dem Lipid über die stärkere Verdünnung eine echte Lösung zu erstellen, schlug fehl und konnte die Ergebnisse nicht verbessern oder eine Reproduzierbarkeit ermöglichen. Die *cmc* (*critical micell concentration*) besagt, dass eine Konzentration existiert, bei der die Anzahl der Lipidmoleküle so gering ist, dass sich keine Mizellen (Vesikel) mehr bilden können. Daher wurde eine weitere Versuchs-Reihe angesetzt, bei der die Lipidkonzentration in dem Wasservolumen noch weiter reduziert wurde. Auch dies führte nicht zu stabilen Nanopartikeldispersionen, aber die Anwesenheit von Nanopartikeln konnte nachgewiesen werden. Eventuell wurde hier auch die minimalste notwendige Konzentration für eine Stabilisierung unterschritten.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das Problem der Vesikelbildung nicht umgangen werden konnte. Es ist offenbar nötig, die Kristallisationskeime vor den Lipidvesikeln zu bilden, um die Stabilisierung der Nanopartikel zu gewährleisten. Dies kann durch Variationen der Fällungsmethode erreicht werden.

4.4.6 Variationen der Fällungsmethode

Die Methode I stellt die bislang durchgeführte Methode dar. Sie soll kurz wiederholt werden, um die Variationen zu verdeutlichen. Es erfolgte zunächst die Vorlage des Wasservolumens (10, 20, 30 mL), dann wurde das in Ethanol gelöste GDNT (1 g L^{-1}) zugegeben, 5 min bei 500 rpm (Mehrfachrührplatte) gerührt und nun die Calcium- und Phosphatlösung zugegeben (Peristaltikpumpe) und 30 min gerührt. Das Problem der instabilen Partikel besteht vermutlich darin, dass die Lipidvesikel vor den Kristallisationskeimen anwesend sind. Um dieses zu umgehen, erfolgte bei Methode II die Zugabe des Lipides erst nach der Zugabe der Calcium- und Phosphatlösung, welche nach wie vor über eine Peristaltikpumpe zugepumpt wurde. Nach 20 s Rühren auf einer Mehrfachrührplatte wurde das gewünschte Lipidvolumen mit einer Eppendorf-Pipette auf einmal zugegeben und wiederum 30 min gerührt. Die Zeitfenster bei der Fällung wurden sehr klein gewählt, was sie recht anfällig für zeitliche Verzögerung machte, so dass die Bedingungen nicht immer völlig identisch waren. Bei Methode III wurden erst je 0,75 mL der Calcium- und Phosphatlösung über die Peristaltikpumpe in einem Eppendorf-Gefäß vermischt, 15 s gewartet und dann 10 s in einem Laborvortex geschüttelt. Es erfolgte eine Zugabe von 0,1 / 0,2 / 0,3 mL GDNT Lösung in Ethanol. Anschließend wurde erneut 10 s in einem Vortex geschüttelt. Dies führte aber schon innerhalb der ersten 20 s zur Agglomeration mit angeschlossener Sedimentation. Die Methode wurde daher nicht weiter verfolgt.

Die neue Methode II wurde für eine Reihe genutzt. Die Probenzusammenstellung und die Ergebnisse der DLS werden in der folgenden Tabelle 17 dargestellt:

Sie zeigt, dass sich die Proben in drei Gruppen unterteilen lassen. Die Probe mit 0,1 mL bildete als einzige der Reihe keine kleinen Partikel, sondern agglomerierte sehr schnell, wodurch eine Sedimentation einsetzte. Die Proben mit 0,2 mL bis 0,9 mL zugegebener Lipidlösung zeigten einen primären Peak mit ca. 70 bis 80 % der nach der Intensität zugeordneten Partikel. Das Maximum der Größenverteilung des hydrodynamischen Radius lag bei 450 bis 600 nm. Der sekundäre Peak hatte eine Intensität von rund 20 % und zeigte eine Partikelverteilung mit einem Maximum zwischen 90 und 170 nm. Der PDI lag oberhalb von 0,3.

Tabelle 17 - Ergebnisse der Reihe zur Überprüfung der neuen Methode II

DLS Untersuchungen der Proben, die mit <u>Methode II</u> dargestellt wurden							
20 mL Wasservorlage, 0,5 mL Calcium- und Phosphatlösung auf pH 8 eingestellt							
GDNT- Zugabe	Beobachtung über	PDI	Peak 1	Peakflächen- verteilung	Peak 2	Peakflächen- verteilung	Bemerkung
mL	Tage		nm	%	nm	%	
0,1	43	0,544	458	79	Agglo- merate	21	Fehler der einzelnen Messungen sehr hoch
0,2	43	0,519	606	77	128	19	Später filtriert, Rückreaktion zu Agglomeraten innerhalb von 8d
0,3	43	0,521	558	78	101	20	
0,4	43	0,521	532	76	109	25	
0,5	43	0,514	469	81	91	23	
0,6	43	0,517	456	74	169	28	
0,7	43	0,500	491	68	100	31	
0,8	43	0,475	502	71	114	35	
0,9	16	0,526	541	54	106	42	
1	16	0,433	601	46	114	52	Mittlere Größe der Peaks wechselt stark

Die Software des Zetasizers belegte jedoch eine zuverlässige Qualität der Messung. Die dritte Gruppe der Proben zeigte sich bei einer Zugabe von 1,0 mL Lipid, denn hier liegen die beiden Peaks ebenfalls vor, aber deren Intensitätsverteilung lag bei fast 1:1 und schwankte sehr stark, so dass der Peak mit dem kleinen Maximum teilweise der Hauptpeak war. Bei den anschließenden REM-Untersuchungen lag das Hauptaugenmerk auf der Probe mit 1,0 mL zugegebenem Lipid, da die Verteilung zwischen kleinen ~100 nm Nanopartikeln und den Agglomeraten bei fast 1:1 lag. Interessanterweise zeigten die REM-Proben zwischen den 10 Proben kaum nennenswerte Unterschiede. Die in Abbildung 4.56 gezeigte Morphologie der Partikel steht stellvertretend für alle Proben dieser Reihe. Diese Morphologie spricht für eine verbrückende Wirkung des Lipides während der Kristallisation. Jedoch sind diese Strukturen nicht mehr sphärisch und deutlich größer als 400 nm. Generell scheint das Lipid aber trotzdem das Wachstum der CalciumphosphatKristalle zu hemmen, da sich

eher ein flächendeckendes Netzwerk aus den oben dargestellten 400 nm Kristallen bildet, als dass einzelne 20-50 µm große Agglomerate entstehen, wie es bei der Calcium- und Phosphatlösungszugabe ohne Lipid der Fall war (Blindprobe).

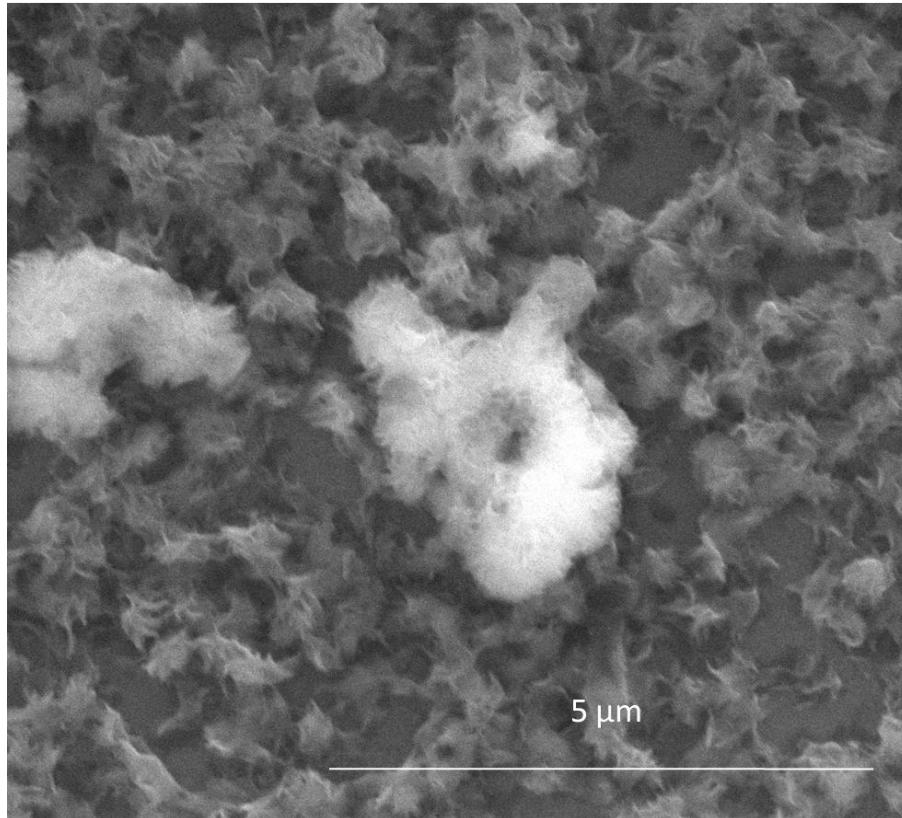


Abbildung 4.56 - Morphologie der Partikel nach der Darstellung über Methode II ohne Reinigung

Die Ergebnisse zwischen den zur REM-Untersuchung auf den Probenträgern eingetrockneten Partikeln und den durch dynamische Lichtstreuung untersuchten Lösungen lassen sich auf der einen Seite nicht vergleichen, da die theoretische Annahme der DLS, dass sphärische Partikel vorliegen, nicht gegeben war.

Andererseits ist es möglich, dass die sternchenförmigen Partikel in Abbildung 4.56 erst bei der Probenvorbereitung, durch Eintrocknen eines Tropfens der Probe auf einem Siliciumwafer, entstehen und in Lösung ein Gleichgewicht zwischen 100 und 600 nm Partikeln vorliegt, welches ein Verhältnis von ca. 7 (100 nm) : 3 (600 nm) hat. Dies ist wahrscheinlicher, da die Proben auch filtriert und zentrifugiert wurden, aber es nicht gelang, die kleinen Nanopartikel zu isolieren, oder die nicht sphärischen Strukturen mit einem 0,28 µm-Filter abzufiltrieren. Die DLS-Messungen zeigten nach wenigen Tagen wieder nahezu dieselbe Größenverteilung mit zwei Peaks wie nach der Fällung.

Überraschenderweise zeigten die REM-Aufnahmen der zentrifugierten Lösungen die Anwesenheit von kleinen sphärischen Nanopartikeln, die bei nahezu allen Proben gefunden wurden.

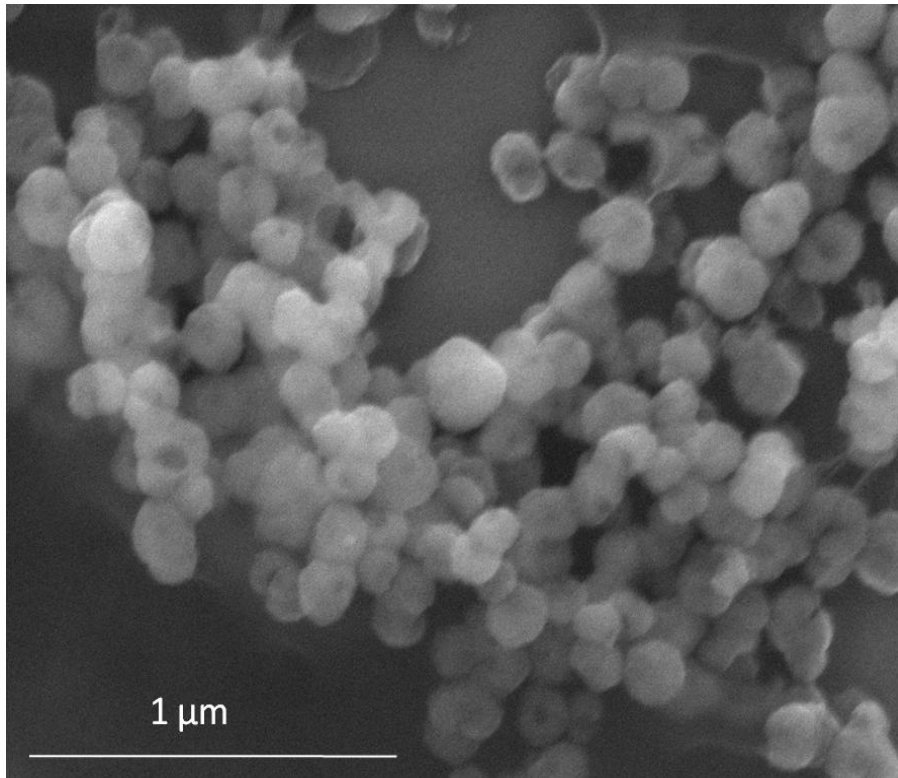


Abbildung 4.57 - Morphologie der Partikel nach der Darstellung über Methode II nach der Reinigung

Abbildung 4.57 zeigt die beste Aufnahme dieser Nanopartikel. Die Probe stammt aus dem Ansatz mit 20 mL Wasservorlage, 0,5 mL Calcium- und Phosphatlösungszugabe, welche dann mit 0,4 mL Lipidlösung stabilisiert wurde. Es stellte sich als sehr problematisch heraus, diese Nanopartikel abzubilden. Bei diesen Proben waren sehr oft große Ansammlungen der wegschmelzenden tropfenartigen Strukturen zu finden, die dem Lipid ohne anorganischen Anteil zugeordnet wurden. Diese Tropfen wurden vor allem bei den Proben mit mehr als 0,5 mL Lipid zu einem großen Problem. Die Nanopartikel zeigten eine Größe von 100 bis 200 nm.

4.4.7 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse aus der Variation der Fällungsmethode

Nach der Variation der Fällungsmethode wurde in der dynamischen Lichtstreuung eine Größenverteilung mit zwei Peaks gemessen, welche zeigt, dass Partikel mit einer Größe von ca. 100 und 500 nm vorhanden sind. Die prozentuale Intensitätsverteilung

der beiden Peaks lag bei 30 und 70 %, wobei die kleinen Partikel den geringeren Anteil darstellten. Diese Dispersionen waren über einen Zeitraum von 43 Tagen stabil. Lediglich die beiden Proben mit 0,9 und 1 mL Lipid waren nur 16 Tage stabil. Nachdem die Proben zentrifugiert wurden, stellte sich heraus, dass der Agglomeratpeak verschwunden war und nach rund einem Tag mit ähnlicher Intensität wieder vorhanden war. Es liegt also ein Gleichgewicht vor. Untersuchungen der Proben am REM ergaben, dass die Probe vor dem Zentrifugieren nur kristalline netzwerkartige Strukturen von Calciumphosphat bildete, deren einzelne Kristalle ca. 500 nm groß sind. Die Morphologie der nicht sphärischen Nanopartikel (Abbildung 4.56) ähnelte stark denen der Blindprobe. Hier wurden Calcium- und Phosphatlösung ohne Lipid zusammengegeben. Es bildeten sich jedoch kaum Agglomerate, die wesentlich größer als 2-3 μm waren, ihr Anteil war zudem sehr gering. Bei der Blindprobe hingegen gehörten die 2-3 μm Kristalle eher zu den kleinsten gefundenen Strukturen. Das Netzwerk der kristallinen Strukturen, die durch das Lipid gebildet wurden, lag bei über 90 % aller gefundenen Strukturen der REM-Proben. Hier zeigten sich aber keine 100 nm-Partikel, die laut dynamischer Lichtstreuung anwesend sein sollten. Diese Nanopartikel zeigten sich erst nach dem Zentrifugieren.

Diese Ergebnisse lassen sich schlüssig erklären, zeigen aber auch, dass das Bilden von Nanopartikeln möglich ist, wenn auch die Menge an gebildeten Nanopartikeln sehr gering ist. Das Grundproblem der Nanopartikelsynthese ist nach wie vor die mangelnde Löslichkeit des Lipides in Wasser, daher wurde die Reihenfolge der Fällung wie oben beschrieben geändert. Es bildet sich aber primär ein kristallines Netzwerk, was offensichtlich durch das Lipid beeinflusst wird, so dass die Agglomeration ausbleibt. Es ist nicht klar, ob das Lipid katalytisch wirkt oder ob es zu einem kleinen prozentualen Anteil in die nicht sphärischen Nanopartikel eingebaut wurde und das Vernetzen der Kristalle ermöglichte. Diese nicht sphärische Struktur ist laut dynamischer Lichtstreuung und REM-Untersuchungen die Fraktion mit dem größten Anteil. Es wäre gut, wenn das gesamte Lipid und das zugegebene Calciumphosphat komplett in Nanopartikel umgewandelt würde, dies gelang jedoch nicht. Nach dem Zentrifugieren konnten die netzwerkartigen Strukturen entfernt werden und die 100 nm Partikel wurden sauber und ohne Kristalle sichtbar. Hier zeigt sich, dass trotz der Netzwerk- und Nanopartikelbildung noch Lipidvesikel existierten, die nicht an den beiden Reaktionen teilgenommen haben.

Dies lässt sich erklären, da das Lipid nach wie vor in wässriger Lösung Vesikel bildet. Beim Herstellen der Proben gibt es ein kurzes Zeitfenster in dem die wässrigen und ethanolischen Lösungen noch nicht vermischt sind. In dem noch reinen Ethanol liegt das Lipid in einzelnen Molekülen ohne ausgebildete Vesikel vor. Vermischen sich die beiden Lösungen, so verteilt sich die ethanolische Lösung schnell im Wasser unter sofortigem Ausbilden der Vesikel. Genau in dem Zeitraum, zwischen den noch einzelnen Lipidmolekülen und den gebildeten Vesikeln, entstehen die Nanopartikel. Denn die Vesikel sind nach dem Zentrifugieren noch in der Lösung vorhanden, da sie kleiner sind als die Nanopartikel werden sie nicht so leicht abzentrifugiert. Bei der Zentrifugation spielt die Dichtedifferenz der Partikel eine wichtige Rolle. Kleine schwerere Partikel können leichter abzentrifugiert werden als große leichtere Partikel.

Vorhergegangene Versuche zeigten für die Vesikel eine Größe von ca. 50 nm. Ist das Bilden der Vesikel abgeschlossen, stoppt auch die Nanopartikelproduktion, aber die Vesikel verhindern gleichzeitig das Bilden von Agglomeraten einer solchen Größe aus Calciumphosphat, so dass diese sich am Boden absetzen.

Aus den Reihen zur variierten Methode konnte die Erkenntnis gewonnen werden, dass die Darstellung von Nanopartikeln in Wasser nicht effizient möglich ist. Bei der neuen Fällungsmethode besteht ein weiteres Problem: Die Zeitfenster bei der Fällung mussten wegen der schnell einsetzenden Flockung des Calciumphosphates sehr kurz gewählt werden. Die Methode war daher anfällig für negative Einflüsse durch zeitliche Verzögerung, was wiederum dazu führte, dass die Bedingungen nicht immer völlig identisch waren. Dies wirkte sich erschwerend auf eine zuverlässige Reproduzierbarkeit aus.

Daher muss ein anderes Lösungsmittel verwendet werden und darüber nachgedacht werden, ob Methode I (Standard-Fällungsmethode aus Kapitel 4.1.1) nicht sinnvoller war. Die Darstellung der Nanopartikel in Ethanol war der nächste Schritt in der Arbeit, denn das Lipid bildet in Ethanol **keine** Vesikel. Sollen die Partikel nach der Darstellung in Wasser überführt werden, muss nach der Darstellung eine Überführung in wässriger Lösung entwickelt werden.

4.5 Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel in Ethanol über Tetraetherlipide

Zu Beginn der Versuche zur Darstellung von Calciumphosphat-Nanopartikeln in Ethanol wurde eine breite Konzentrationsspanne von Proben angesetzt und deren Langzeitstabilität untersucht.

4.5.1 Darstellung der Calciumphosphat-GDNT-Nanopartikel in Ethanol

Die Messreihen wurden mit einer Volumenvorlage von 20 mL Ethanol begonnen, zu dem 0,25 / 0,5 / 0,75 und 1,0 mL GDNT-Ethanol-Lösung gegeben wurde. Hier konnte nach 30 min Rühren keine Größenverteilung gemessen werden, die die Anwesenheit von Vesikeln bestätigte. Aufgrund dessen wurden verschiedene Konzentrationen an Calcium- und Phosphatlösungen (in Wasser angesetzt) bei pH 8 und 9 zugegeben, um die Partikelbildung zu prüfen. Die Kombination 20 mL Ethanol mit 0,25 mL GDNT-Lösung (pH 8) und 0,25 mL Calcium- und Phosphatlösung stellte sich als ideal heraus. Die gemessenen Partikelgrößenverteilungen sind reproduzierbar und über 9 Monate stabil.

Tabelle 18 - Erste Testreihe zu den GDNT-CaP-Nanopartikeln: 20 mL Ethanol- und 0,25 mL GDNT-Vorlage mit der Zugabe verschiedener Calcium- und Phosphatlösungsvolumina

Erste Testreihe zu den GDNT-CaP-Nanopartikeln in Ethanol dargestellt				
20 mL Ethanol, 0,25 mL GDNT und Calcium- und Phosphatlösung mit pH 8				
Volumen an Calcium- und Phosphatlösung	Beobachtung über	PDI	Mittelwert der Größe	Bemerkung
mL	Tage	Mittelwert	nm	
0,25	>200	0,207	230	
0,5	>200	0,227	248	
0,75	>200	0,232	461	einsetzende Agglomeration
1	126	0,310	693	
1,5	2	0,164	425	nach 3 Tagen Sedimentation
2	0	>0,3	>1000	nach/während des 30 min Rührens setzte die Sedimentation ein
2,5	0	>0,3	>1000	
3	0	>0,3	>1000	

4.5 Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel in Ethanol über Tetraetherlipide

Tabelle 18 zeigt die angesetzten Proben und die daraus resultierenden Größenverteilungen. Ihr ist zu entnehmen, dass bei der GDNT-Konzentration von 0,25 mL die Proben mit 0,25 und 0,5 mL Calcium- und Phosphatlösung die besten Ergebnisse liefern. Sie zeigen einen PDI unter 0,3 und die Partikel haben einen mittleren hydrodynamischen Radius von unter 300 nm. Die Stabilität ist mit über 200 Tagen sehr gut.

Das folgende Diagramm (Abbildung 4.58) zeigt, dass die Partikelgrößen der 0,25 mL GDNT-Proben mit einer Zugabe von 0,25 und 0,5 mL Calcium- und Phosphatlösung konstant sind. Die Proben mit einer Zugabe von 0,75 und 1,0 mL Calcium- und Phosphatlösung zeigen in Abbildung 4.58 einen sehr großen Fehler. Der Wert des *Z-Average* liegt beim Betrachten der Ausgleichsgeraden bei sehr vielen Proben stark neben der Geraden. Bei den Proben mit 0,25 und 0,5 mL Calcium- und Phosphatlösung ist die Abweichung nur sehr gering. Proben mit mehr als je 1,0 mL Calcium- und Phosphatlösung wurden nicht im Diagramm dargestellt, da sehr schnell eine Sedimentation einsetzte.

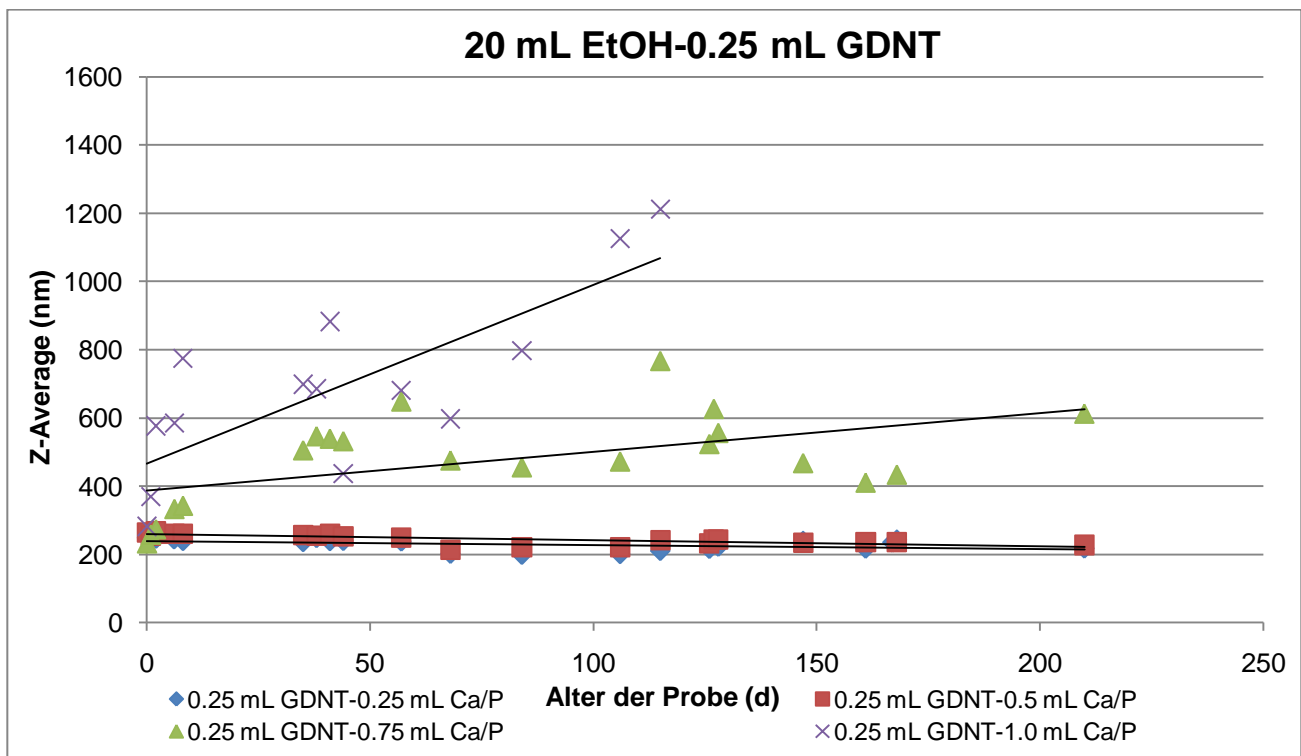


Abbildung 4.58 - Diagramm zur Partikelgrößenveränderung von GDNT-Calciumphosphat-Nanopartikeln (0,25 mL GDNT)

4.5 Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel in Ethanol über Tetraetherlipide

Tabelle 19 - Zweite Testreihe zu den GDNT-CaP-Nanopartikeln in Ethanol dargestellt, 20 mL Ethanol- und 0,5 mL GDNT-Vorlage und verschiedene Calcium und Phosphatvolumen

20 mL Wasservorlage, 0,5 mL GDNT und Calcium- und Phosphatlösung pH 8				
Zugegebenes Volumen an Calcium- und Phosphatlösung	Beobachtung über	PDI	Mittelwert der Größe	Bemerkung
mL	Tage	Mittelwert	nm	
0,25	>200	0,229	249	
0,5	>200	0,206	280	
0,75	>200	0,213	289	
1	114	0,187	354	Nach 67 d Sedimentation

In Tabelle 19 folgt eine Messreihe mit dem doppelten zugegebenen Volumen (0,5 mL) an GDNT. Hier sollte sich herausstellen, ob eine höhere Konzentration an GDNT die Partikel schneller stabilisiert, so dass in Lösung noch kleinere Partikel entstehen. Tabelle 19 zeigt, dass auch diese Reihe gute Ergebnisse zeigt, weist aber größere Partikel auf. Werden die Stabilitäten dieser Dispersionen mit denen der vorherigen Reihe (0,25 mL GDNT-Zugabe) verglichen, so sind diese ähnlich.

Insgesamt sind die besten Ergebnisse beider Reihen aber die Proben mit einer GDNT-Konzentration von 0,25 mL und einer Calcium- und Phosphatlösungszugabe von 0,25 und 0,5 mL, da deren PDI, genau wie die Partikelgröße, kleiner ist. Ein weiteres Problem der Reihe mit 0,5 mL GDNT ist in Abbildung 4.59 sichtbar, denn hier zeigt sich, dass auch bei den geringen Zugaben an Calcium- und Phosphatlösung die Abweichung der gemessenen Partikelgrößen von der Ausgleichsgeraden viel höher ist als bei der Reihe mit 0,25 mL.

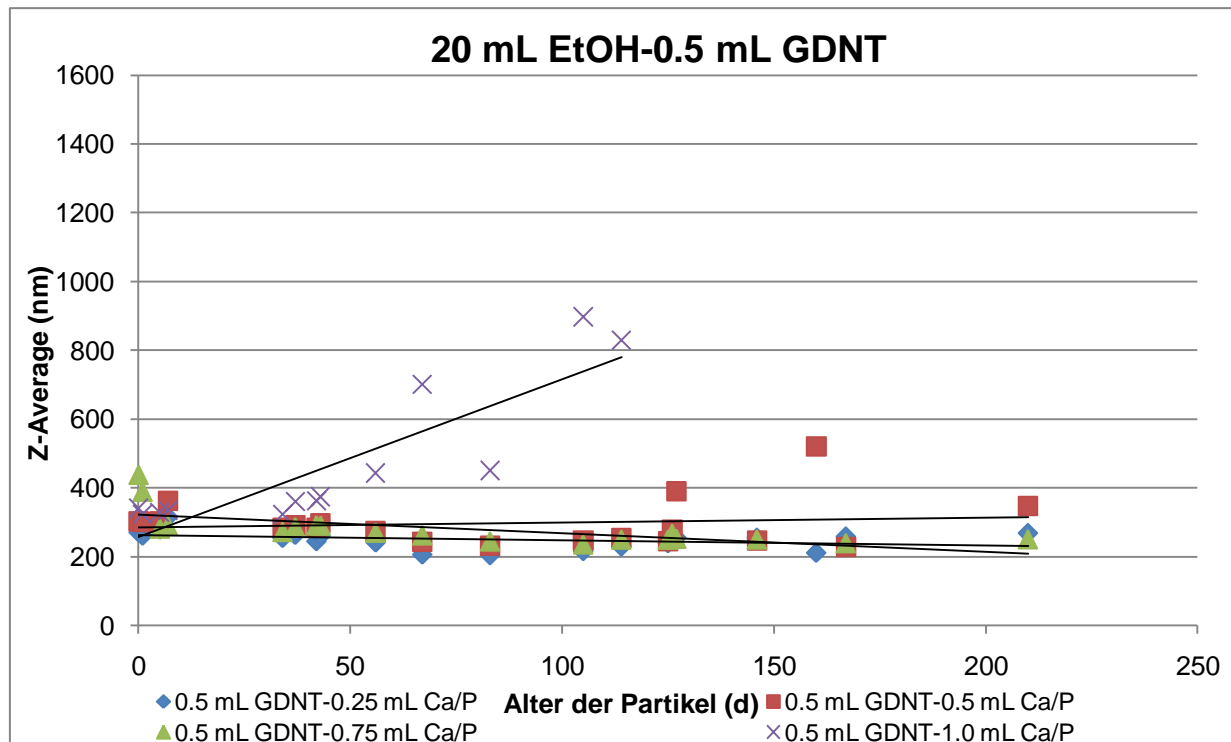


Abbildung 4.59 - Diagramm zur Partikelgrößenveränderung von GDNT-Calciumphosphat-Nanopartikeln (0,5 mL GDNT)

Die beiden oben beschriebenen Reihen wurden am REM untersucht. Alle Proben, die in der dynamischen Lichtstreuung eine Größe von unter 300 nm besaßen, zeigten im REM auch Nanopartikel. Jedoch nahm die sichtbare Verunreinigung auf dem Probenträger (Kristalle wie in der Blindprobe, Lipidvesikel u.ä.) mit steigender Lipid-, Calcium- und Phosphatlösungszugabemenge ebenfalls zu. Daher wurde die Probe mit 20 mL Ethanol, 0,25 mL GDNT und je 0,25 mL Calcium- und Phosphatlösung primär weiterverfolgt und wird ab jetzt als **Standard-GDNT-Probe** bezeichnet. Abbildung 4.60 zeigt eine REM Aufnahme mit einigen exakten Partikelgrößen der Nanopartikel, welche über den Größenmaßstab ausgemessen und berechnet wurden. Die Größen liegen zwischen ca. 40 und 140 nm. Die **Standard-GDNT-Probe** zeigte bei REM-Untersuchungen agglomerierte und auch einzeln vorliegende Nanopartikel. Die Anzahl der kleinen Nanopartikel überwiegt sehr deutlich.

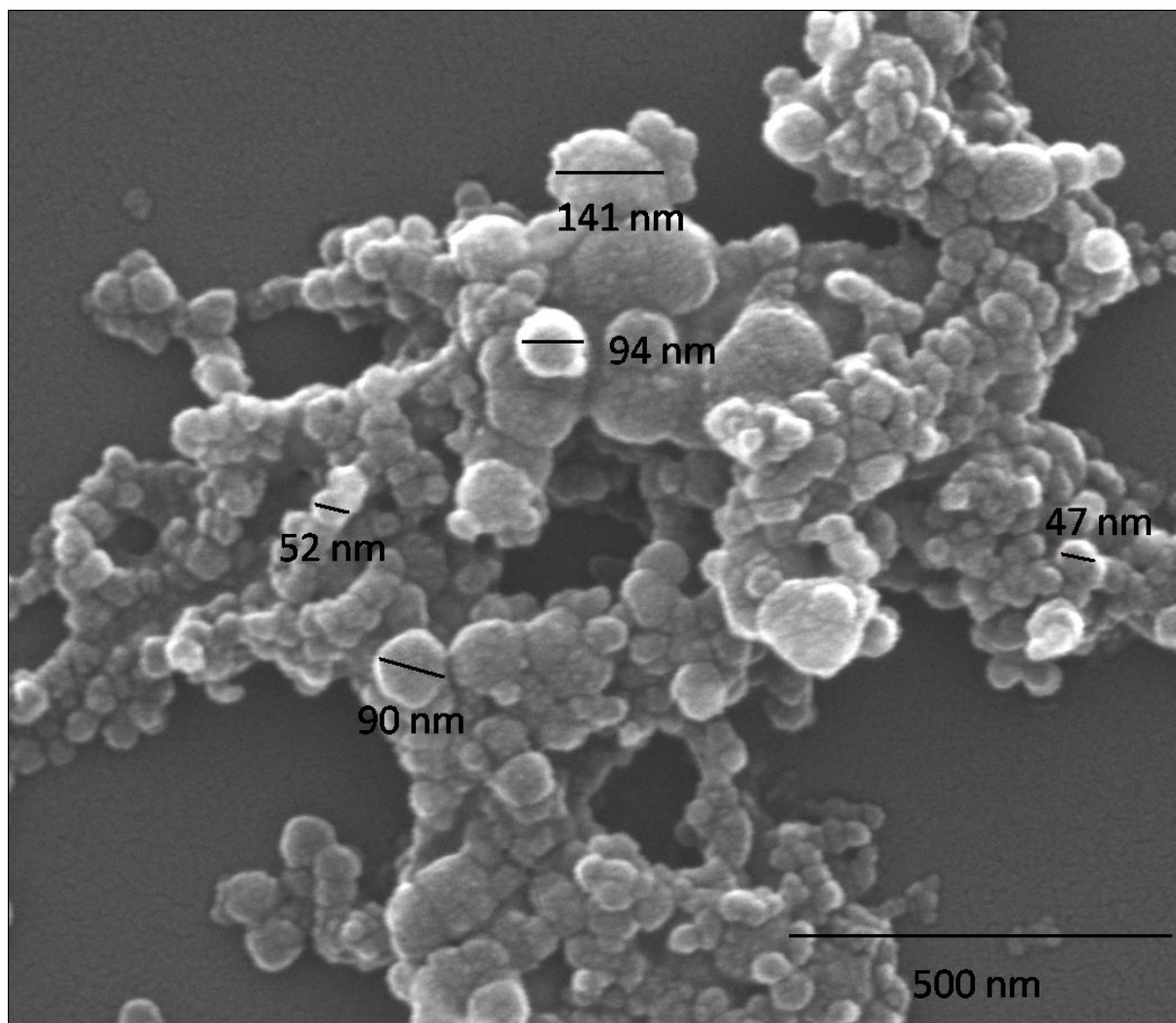


Abbildung 4.60 - REM-Aufnahme einer Standard-GDNT-Probe

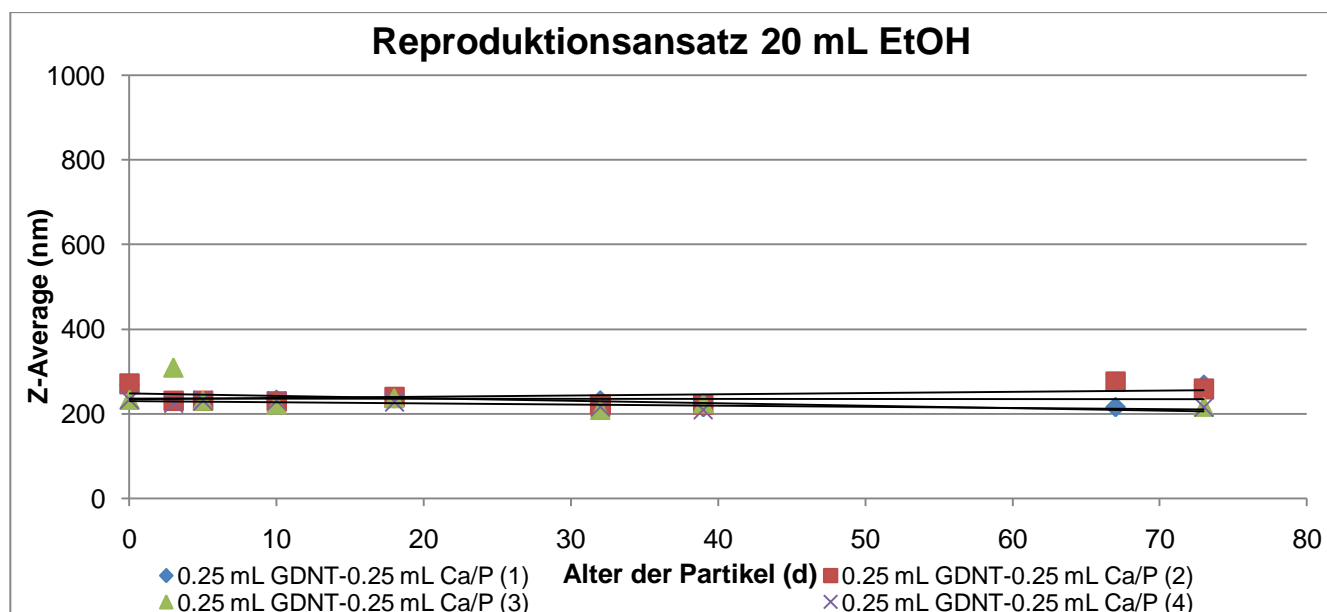


Abbildung 4.61 - Diagramm zur Reproduzierbarkeit der Standard-GDNT-Proben

4.5 Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel in Ethanol über Tetraetherlipide

Abbildung 4.61 zeigt, dass die **Standard-GDNT-Probe** reproduzierbar ist. Die vier gleichzeitig angesetzten und gemessenen Proben zeigen geringe Abweichungen voneinander. Die Proben zeigen einen mittleren hydrodynamischen Radius von 234 nm in der Dispersion (Abbildung 4.62). Die REM-Untersuchungen der Proben zeigten, dass die Größenverteilung zwischen 120 und 600 nm liegt. Für Untersuchungen wie XRD, IR oder TG liefern diese Proben allerdings viel zu wenig Masse. Der Ansatz einer **Standard-GDNT-Probe** lieferte ca. 0,15 mg Nanopartikel. Dies wurde über einen Ansatz gemessen, der abzentrifugiert wurde. Der Überstand ergab in einer DLS-Messung keine Anwesenheit mehr von Nanopartikeln, also wurden alle Nanopartikel abzentrifugiert. Für die Ausbeutebestimmung war nicht wichtig, dass die Nanopartikel diese Prozedur nicht unbeschadet überstehen. Die oben angegebene Masse stellt die Masse des Rückstandes dar.

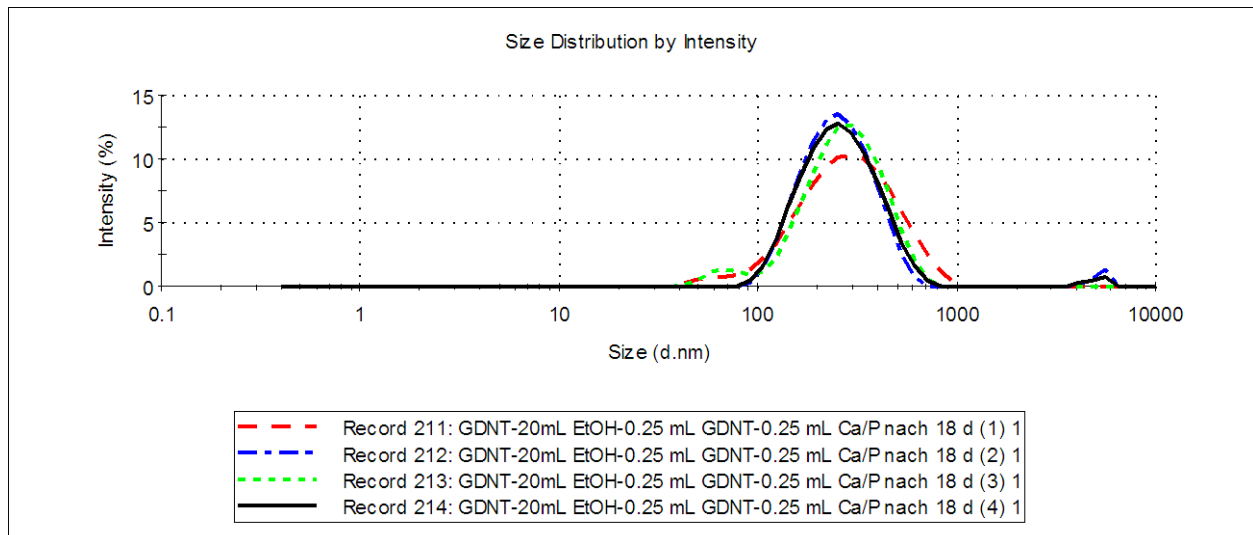


Abbildung 4.62 - Größenverteilung der auf Reproduzierbarkeit getesteten vier Standard-GDNT-Proben nach 18 Tagen Alterung.

Daher wurden größere Ansätze getestet, ohne die Fällungsmethode zu verändern. Die verwendeten Roll-Randgläschen, in denen die Reaktion der Standard-Fällungsmethode der 20 mL **Standard-GDNT-Probe** ablief, wurden weiterhin auch für den doppelten Ansatz genutzt. Diese Erhöhung der Menge verlief, ohne dass eine Verschlechterung der Reproduzierbarkeit eintrat. Im Gegenteil, die Größenverteilung der Partikel erschien weniger breit und mit weniger Abweichung voneinander. Abbildung 4.63 zeigt die ersten angesetzten doppelten Ansätze. Im Mittel lag das Maximum des hydrodynamischen Radius dieser Proben bei 229 nm, was leicht unter dem Wert für die einfachen Ansätze

4.5 Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel in Ethanol über Tetraetherlipide

liegt. Vom doppelten Ansatz wurden allerdings auch wesentlich mehr Proben angesetzt, so dass die wenigen Messfehler das gesamte Ergebnis weniger beeinflussten.

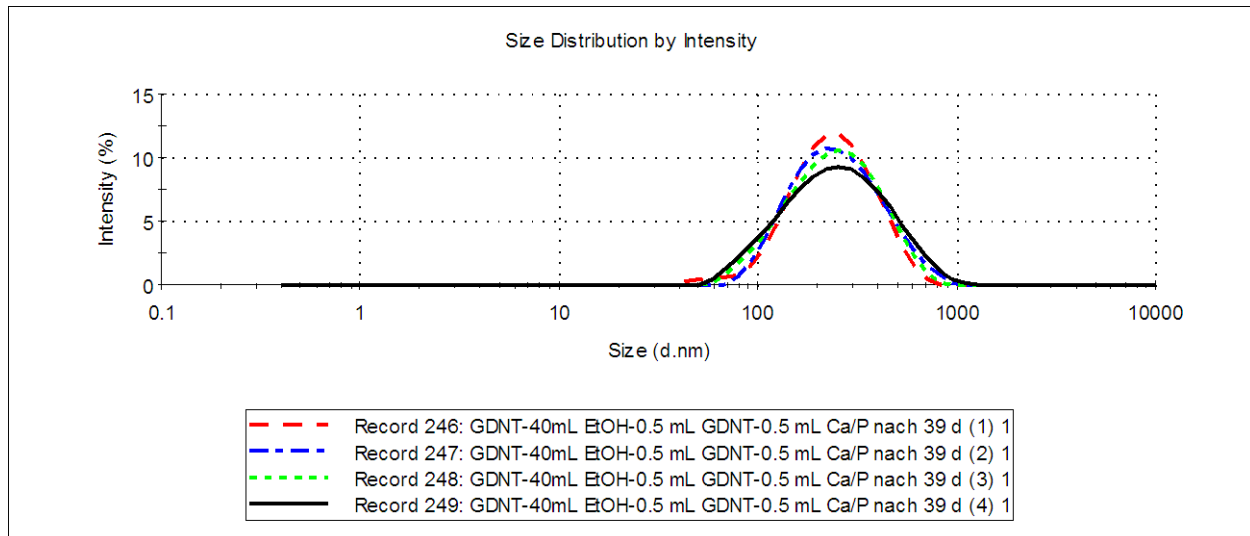


Abbildung 4.63 - Größenverteilung der auf Reproduzierbarkeit getesteten vier Standard-GDNT-Proben nach 39 Tagen Lagerung.

EDX-Untersuchungen dieser Proben zeigten einen Kohlenstoffgehalt von 48,5 %, einen Sauerstoffgehalt von 40,8 %, einen Calciumanteil von 6,6 % sowie einen Phosphoranteil von 3,8 %. Dies bedeutet ein Calcium zu Phosphor-Verhältnis von 1,74, was fast exakt für Hydroxylapatit steht, denn dessen Verhältnis ist 1,67^[38]. Dieses Ergebnis liegt aber auch im molaren Verhältnis für amorphes Calciumphosphat (1,2 bis 2,5)^[38].

Abbildung 4.63 zeigt mehrere über die dynamische Lichtstreuung gemessene Größenverteilungen des hydrodynamischen Radius der Nanopartikel in den doppelten Ansätzen.

Abbildung 4.64 zeigt die geringe Abweichung der einzelnen Proben voneinander. Die folgende REM-Aufnahme (Abbildung 4.65) zeigt eine Probe eines 40 mL Ansatzes. Die Größe variiert nicht so stark wie bei den 20 mL Ansätzen, die Partikel sind nicht so stark verwachsen und die maximale Größe der Partikel ist kleiner, wie die Anzahl der großen Partikel auch kleiner ist. Abbildung 4.65 zeigt Nanopartikel, die zwischen 30 und 80 nm groß und selten größer als 100 nm sind.

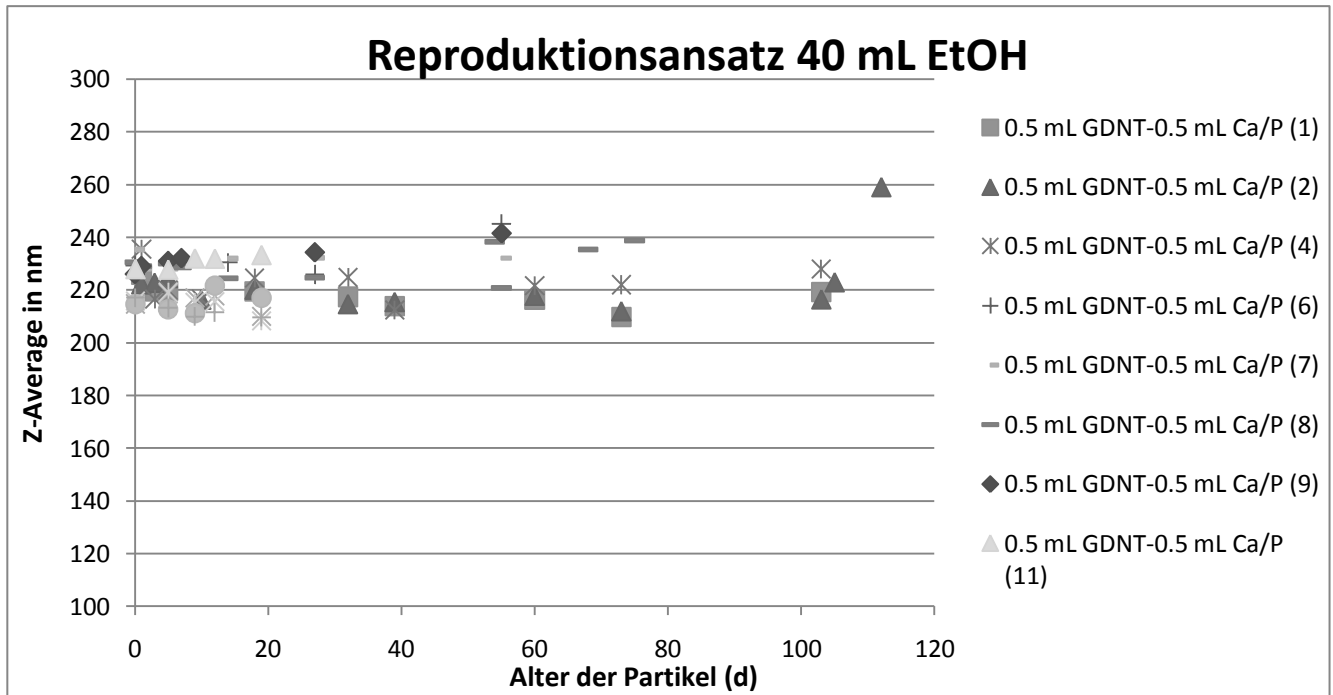


Abbildung 4.64 - Reproduzierbarkeit der Standard-GDNT-Probe (doppelter Ansatz)

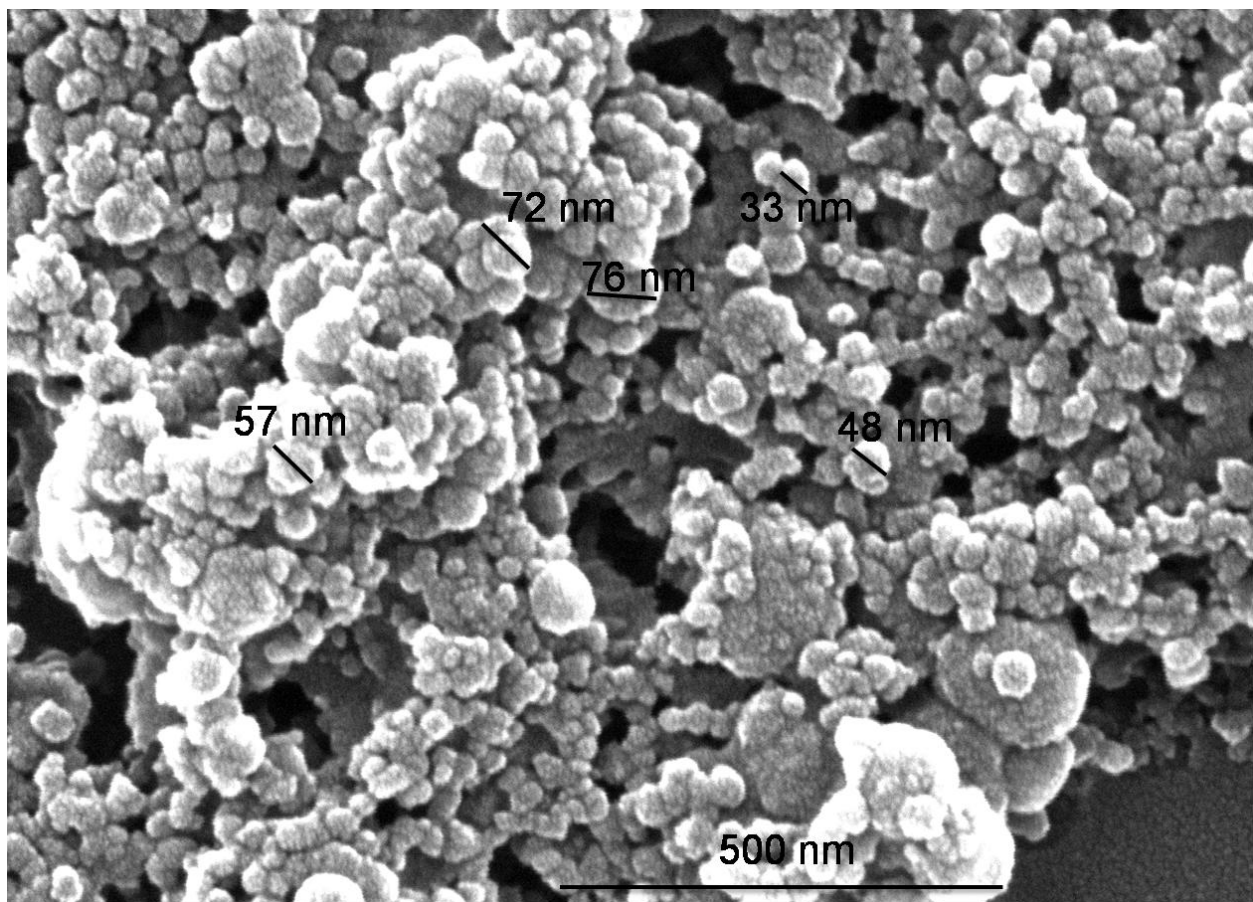


Abbildung 4.65 - REM-Aufnahme der Nanopartikel eines 40 mL Ethanol Standard-GDNT-Ansatzes

Das TEM-Bild von Abbildung 4.66 entstand im Rahmen eines DAAD-Projektes mit der Arbeitsgruppe von Prof. A. Bigi aus der Fakultät für Chemie *Giacomo Ciamician* der *Università di Bologna* und zeigt ein TEM-Bild einer **Standard-GDNT-Probe** vor der Reinigung. Die TEM Untersuchungen wurden mit einer angelegten Spannung von 80 kV und 60.000 bis 130.000 facher Vergrößerung durchgeführt. Sie zeigen die starke Vernetzung der Partikel untereinander. Die Größen der Nanopartikel, welche über DLS gemessen wurden, sind identisch zu denen, die im REM gefunden wurden und liegen zwischen 40 und 90 nm.

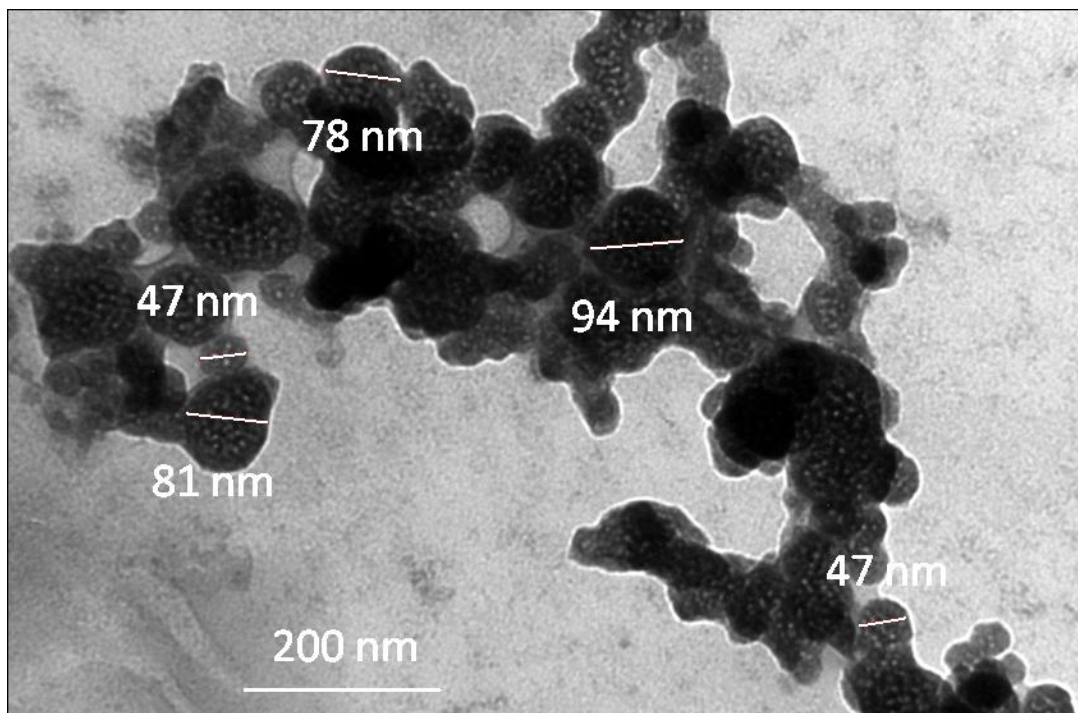


Abbildung 4.66 - TEM-Aufnahme der Standard GDNT-Probe vor der Reinigung

REM- und TEM-Bilder belegen, dass die Nanopartikel stark verwachsen sind. In den hier nicht gezeigten Übersichtsaufnahmen sind neben den Nanopartikeln auch immer wieder Kristalle von Natriumchlorid und diversen Verunreinigungen (Gegenionen der verwendeten Lösungen) vorhanden, so dass eine Reinigungsprozedur für eine einwandfreie Charakterisierung nötig ist.

4.5.2 Reinigung der Calciumphosphat-GDNT-Nanopartikel in Ethanol

Aufgrund der sehr niedrigen Mengen an Nanopartikeln, die ein Ansatz ergibt, konnten Filtrationen nicht durchgeführt werden. Ein 40 mL-Ansatz lieferte ca. 0,5 mg Feststoff nach dem Zentrifugieren. Standardzentrifugen können jedoch diese „kleinen“

Nanopartikel nicht abzentrifugieren, daher wurde eine Ultrazentrifuge verwendet. Des Weiteren wurden auch Dialysereihen durchgeführt.

4.5.2.1 Reinigung der Nanopartikel durch Ultrazentrifugation

Die 40 mL-Ansätze wurden in der Ultrazentrifuge mit verschiedenen Drehzahlen und Zentrifugierzeiten verschiedenen mechanischen Belastungen ausgesetzt. Es wurden Proben 30 min lang bei $40.000 \text{ U min}^{-1}$, 60 min lang bei 30.000 Umin^{-1} oder 120 min lang bei $15.000 \text{ U min}^{-1}$ zentrifugiert. Das Ergebnis der ersten beiden Bedingungen war zwar, dass sich alle Feststoffe abgesetzt hatten, jedoch konnten im Niederschlag keine Nanopartikel mehr gefunden werden. Alle sichtbaren Strukturen zeigten im REM Hydroxylapatit und schnell schmelzende Lipidtropfen, die eine Zerstörung der Nanopartikel bestätigten. Daher konnten die Probe auch nicht erfolgreich im Ultraschallbad redispergiert werden. Die 120 min lang bei $15.000 \text{ U min}^{-1}$ zentrifugierten Proben zeigten Nanopartikel, die unverändert zur vorhergegangenen Probe aussahen. Sie sind stark vernetzt und nach wie vor nicht ausreichend gereinigt. Der Niederschlag musste also gewaschen und die Nanopartikel redispergiert werden. Dies gelang jedoch nicht, die Partikel wurden durch Behandlungszeiten $< 60 \text{ s}$ im Ultraschallbad zerstört, so dass im REM das Calciumphosphat und das Lipid separiert vorlag. Die Ultrazentrifugation war nicht erfolgreich, daher wurde die Dialyse als nächste Reinigungsmethode verwendet.

4.5.2.2 Dialyse der Nanopartikel

Die Dialyse sollte als sanfte Reinigungsmethode für die Nanopartikel eingesetzt werden. Die verwendeten Schläuche haben ausreichend große Poren, um alle Ionen und Lipidmoleküle durch die Membran diffundieren zu lassen, die Nanopartikel bleiben jedoch im Innern des Schlauches gefangen. Das Lipidmolekül sollte mit einer Molmasse von $\sim 1450 \text{ g mol}^{-1}$ kleiner als $1,5 \text{ nm}$ sein. In den ersten Versuchen wurde die Dialyse einer 5 mL-Probe über 24 h in einem Reinigungsvolumen von 1 L Wasser durchgeführt, was ein Auflösen der Partikel nach sich zog. Der Austausch des Wassers gegen 800 mL Ethanol verhinderte dies und führte gleichzeitig zu einer Reinigung der Nanopartikel. Die nachfolgenden REM-Bilder zeigen die Nanopartikel nach 6 h und 22 h Dialysedauer.

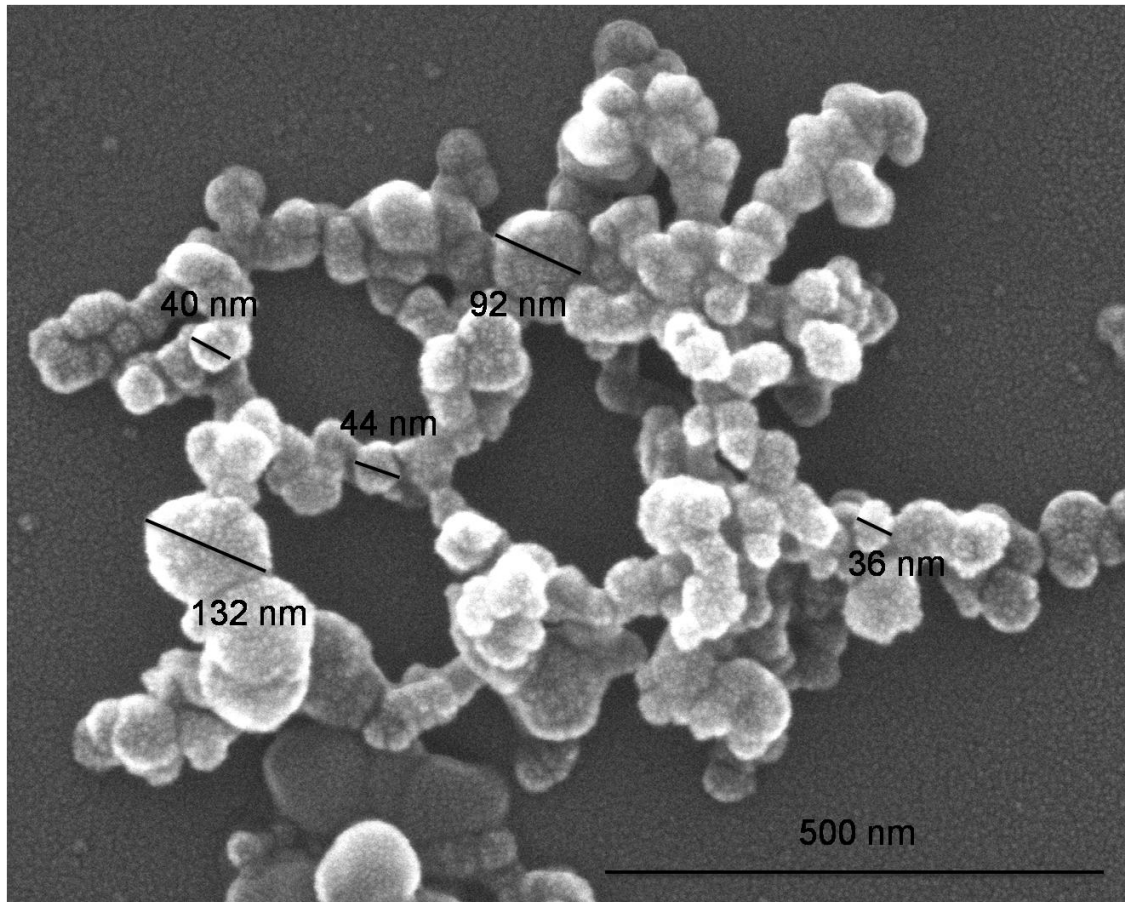


Abbildung 4.67 - REM-Aufnahme der GDNT-Nanopartikel nach 6 h Dialyse in Ethanol

Abbildung 4.67 und 4.68 zeigen, dass die Nanopartikel nicht mehr so stark verwachsen vorliegen. Sie sind in der Größe unverändert zwischen 40 und 120 nm. Eine Verbesserung der Reinigung zwischen einer 6- und 22-stündigen Dialyse konnte aus den REM-Bildern nicht entnommen werden. Daher scheint nach spätestens 6 Stunden der Konzentrationsgradient zwischen Reinigungsethanol und der Probe zu einem Gleichgewicht ausgeglichen zu sein. Es soll an dieser Stelle jedoch erwähnt werden, dass diese Bilder primär die Reinheit der Nanopartikel zeigen sollen. Es sind in anderen, hier nicht gezeigten REM-Aufnahmen, noch kristalline Strukturen zu sehen, die belegen, dass die Dialyse noch nicht optimal verläuft, aber schon gute Erfolge erzielt.

Nach den ersten erfolgreichen Dialysen wurden die gereinigten Nanopartikel mit Hilfe der Ultrazentrifuge abgetrennt. Hier konnten bei $15.000 \text{ U min}^{-1}$ über zwei Stunden zwar Nanopartikel abgetrennt werden, jedoch zeigten diese wieder keine Redispergierbarkeit und waren wieder stark verwachsen.

4.5 Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel in Ethanol über Tetraetherlipide

Dies kann durch eine teilweise erfolgte Zerstörung der Nanopartikel erklärt werden, was ein Verklumpen der Nanopartikel nach sich zog. Weitere Dialyseversuche zeigten, dass ohne Erneuern des Waschethanols die zuerst genutzten 6 h optimal sind. Kürzere Zeiten (vier und fünf Stunden) und längere Zeiten (sieben und acht Stunden) ergaben keine besseren Reinigungsergebnisse, oder zeigten, insbesondere bei den kürzeren Zeiten noch mehr Verunreinigungen. Somit kann die Dialyse nur verbessert werden, wenn das Reinigungsmedium gewechselt wird.

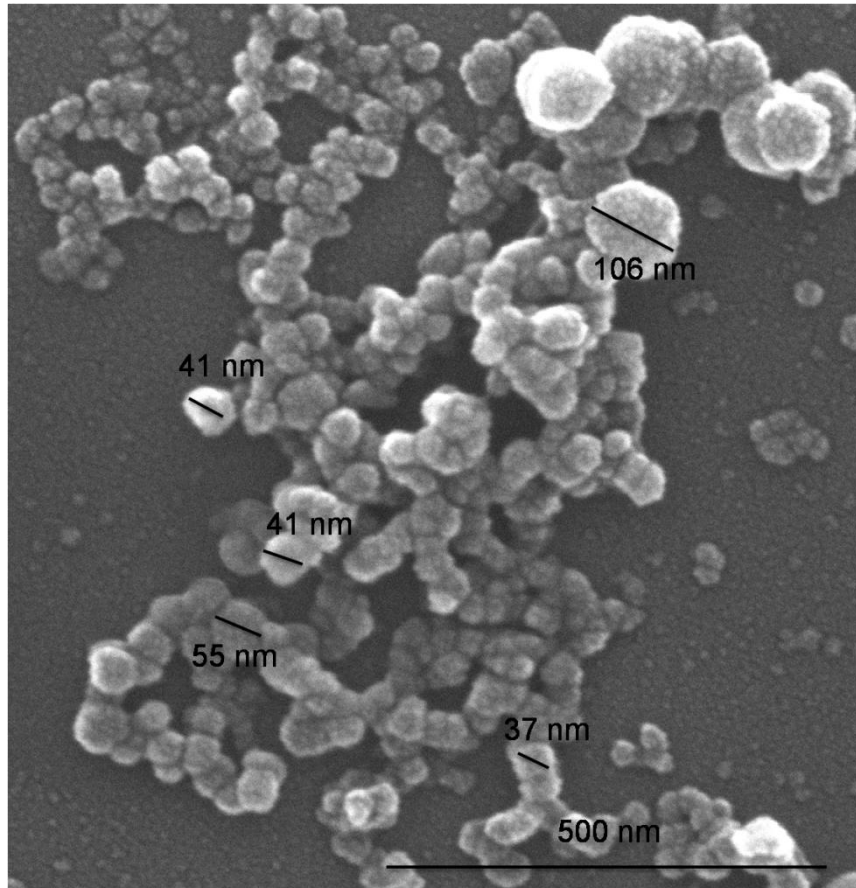


Abbildung 4.68 - REM-Aufnahme der GDNT-Nanopartikel nach 22 h Dialyse in Ethanol
Zur Verbesserung der Dialyse wurde das Volumen des zur Reinigung eingesetzten Ethanols auf 900 mL erhöht und testweise nach 1,5 / 2 / 2,5 h gewechselt. Dies führte zwar bei REM-Untersuchungen zu Proben ohne kristalline Verunreinigungen (durch die Restionen), jedoch lag der Grad der Verwachsung wesentlich höher als bei den bisherigen Dialysedauern. Interessant war auch das Vorliegen von einzelnen Nanopartikeln, welche Abbildung 4.69 zeigt.

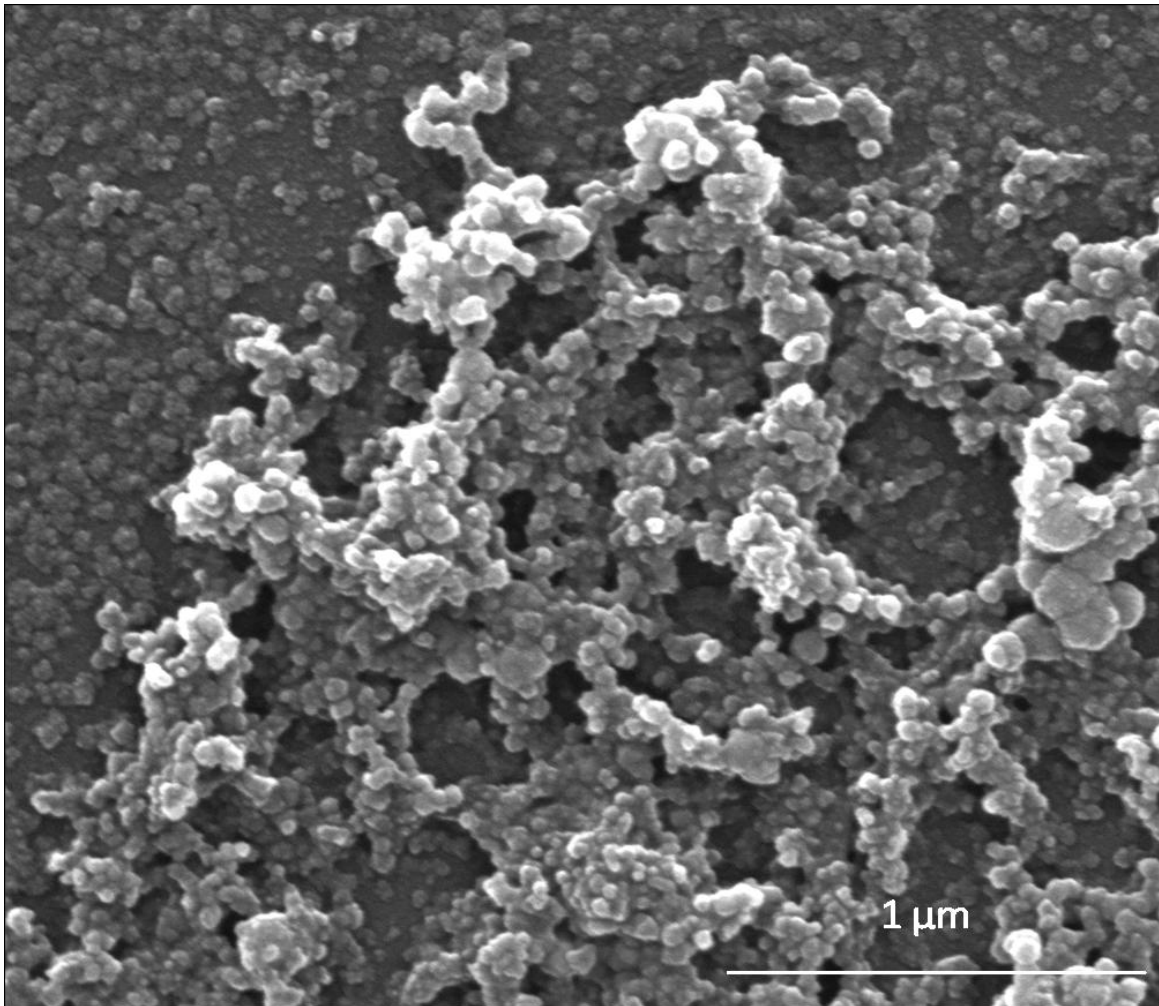


Abbildung 4.69 - REM-Aufnahme einer Dialyse-Probe mit Mediumwechsel nach 2 h

Die Lösung dieses Problems brachte die Behandlung der Probe vor der Dialyse in einem Ultraschallbad. Diese Ultraschallbehandlung der Probe über eine Minute hatte kaum einen Einfluss. Die drei Minuten lange Behandlung hingegen war optimal und fünf Minuten führten zur Zerstörung der Nanopartikel. In der dynamischen Lichtstreuung konnte nach der drei-minütigen Ultraschallbehandlung (vor der Dialyse) eine signifikante Verkleinerung der Partikelgrößenverteilung gemessen werden. Die mittlere Größe der Partikel sank von ca. 230 nm auf ca. 180 nm. PDI und die Qualität der Messung blieben im zuverlässigen Bereich.

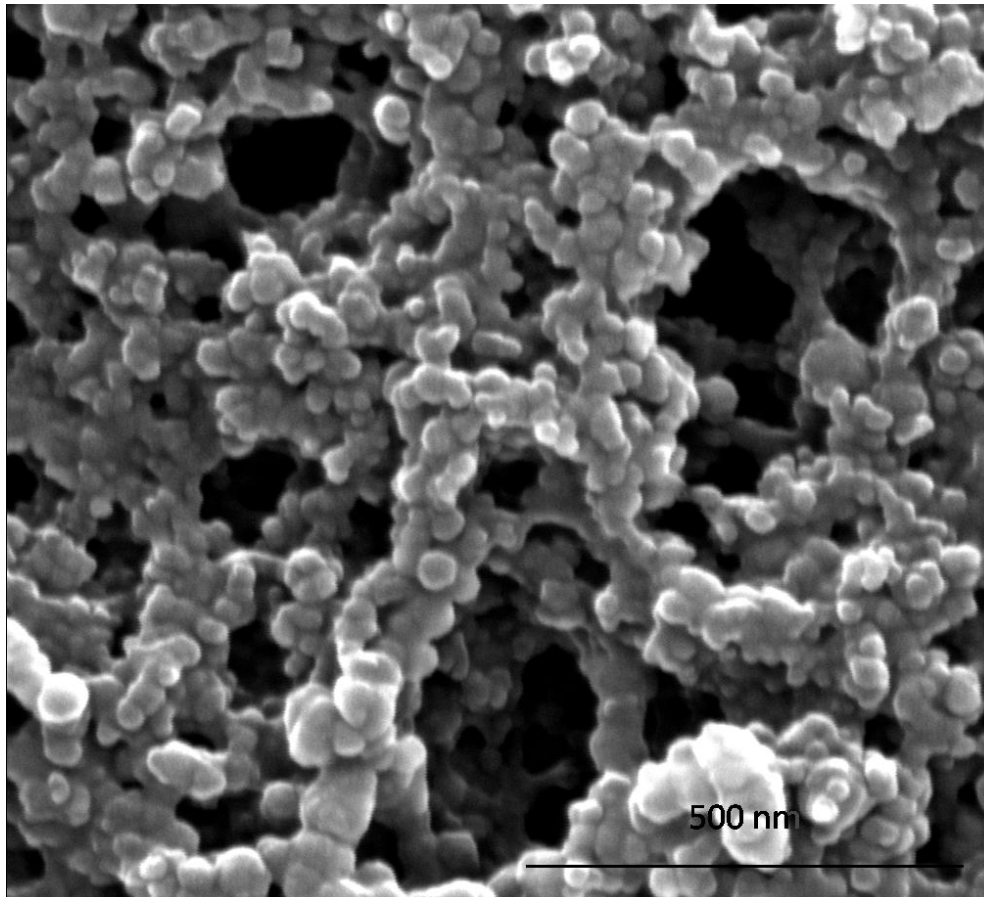


Abbildung 4.70 - REM-Aufnahme der Nanopartikel nach 3 min Ultraschallbehandlung und Dialyse mit Mediumwechsel nach 2 h

Abbildung 4.70 zeigt das typische Bild der Nanopartikel nach drei-minütiger Ultraschallbehandlung vor der Dialyse über 4 h mit Mediumwechsel nach 2 h.

4.5.3 Charakterisierung der Calciumphosphat-GDNT-Nanopartikel in Ethanol

Die Charakterisierung der Nanopartikel erfolgte in erster Linie über EDX-Untersuchungen. Diese Messungen sind allerdings recht ungenau, da jedes Element eine spezifische Anregungsenergie hat und an dem EDX-Gerät nur eine bestimmte Spannung eingestellt werden kann, dann aber alle anderen anwesenden Elemente auch gemessen werden. Hier wurde die Spannung so eingestellt, dass die Calcium $K\alpha$ -Linie optimal angeregt wird. Es sind dafür 3,69 keV nötig, wogegen Sauerstoff und Kohlenstoff nur 0,4-0,5 keV für eine Anregung der $K\alpha$ -Linie benötigen. Daraus folgt für Kohlen- und Sauerstoff eine wesentlich leichtere Anregung, was das Verhältnis zwischen den einzelnen Elementen verzerrt. Ein weiteres Problem ist die Eindringtiefe des Elektronenstrahles. Hier werden bei den EDX-Messungen der untersuchten Proben

4.5 Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel in Ethanol über Tetraetherlipide

meistens sehr hohe %-Anteile des Spektrums dem Silicium zugeordnet, welches als Probenträger dient. Abbildung 4.71 belegt dieses Problem sehr eindeutig. Da die Dicke des Nanopartikelfilms auf dem Probenträger sehr gering ist, durchdringt der Strahl die Nanopartikel leicht und regt viele Siliciumatome an. Hier kommt es beim Subtrahieren des Siliciumsignales zu einem großen Fehler, denn Phosphor und Calcium gehen nahezu im Rauschen unter. Natrium und Chlor sind noch durch das pH-Einstellen der Calcium und Phosphatlösung anwesend. Gold zeigt sich im EDX aufgrund der Bedampfung der Probe zur REM-Untersuchung.

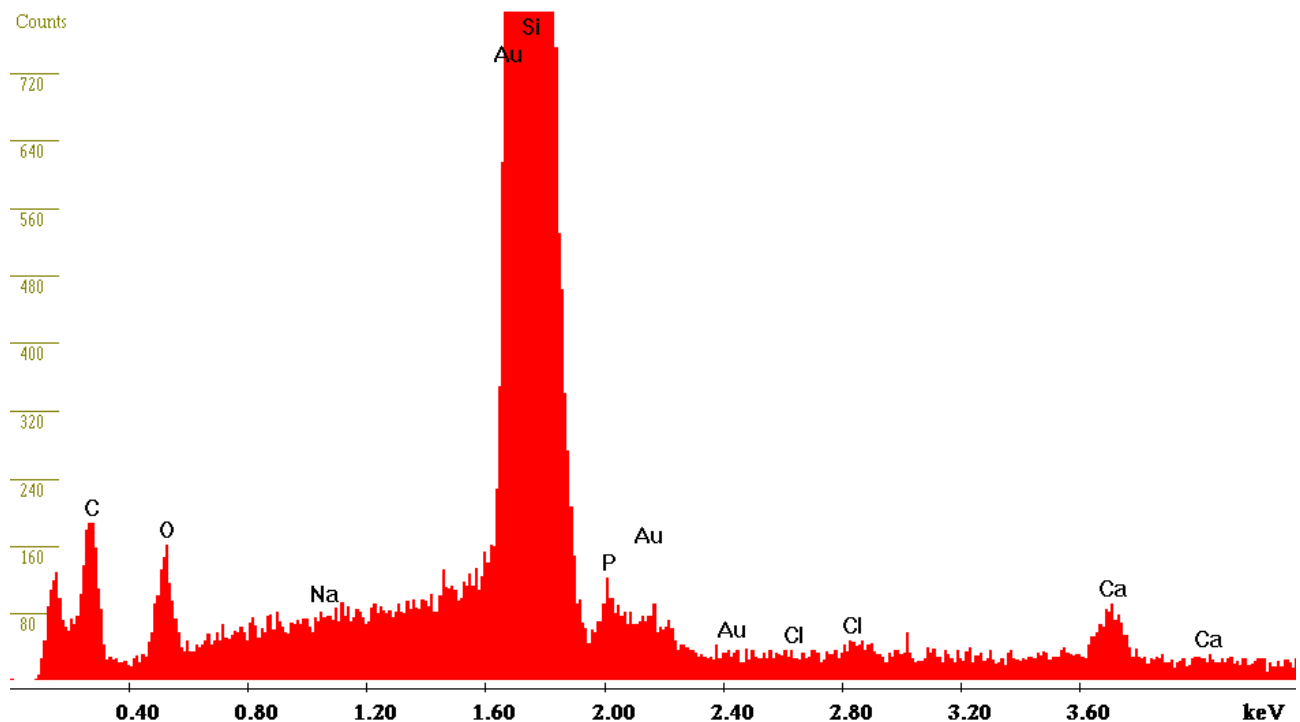


Abbildung 4.71 - EDX-Messung der GDNT-CaP-Nanopartikel nach der Dialyse

Die folgenden Tabellen 20 und 21 zeigen die Auswertung von EDX-Messungen zur elementaren Zusammensetzung der Nanopartikel. Dargestellt werden die Gewichtsprozente. Tabelle 20 zeigt die Nanopartikel vor der Dialyse, Tabelle 21 die Partikel nach der Dialyse. Tabelle 20 zeigt, dass sich die Nanopartikel zu 48,20 % aus Kohlenstoff, 40,97 % aus Sauerstoff, zu 6,97 % aus Calcium sowie zu 3,54 % aus Phosphor zusammensetzen. Daraus resultiert ein Calcium / Phosphat Verhältnis von 1,97. Aufgrund der ungenauen Messung des EDX kann nicht unterschieden werden, ob es sich um Hydroxylapatit oder amorphes Calciumphosphat handelt.

Tabelle 20 - Charakterisierung der GDNT-CaP-Nanopartikel vor der Dialyse

EDX Auswertung vor der Dialyse (ohne zentrifugieren)									
vor Dialyse	1	2	3	4	5	6	7	8	Mittelwert
	wt%	wt%	wt%	wt%	wt%	wt%	wt%	wt%	wt%
C	49,44	53,70	52,84	46,40	57,29	46,20	39,97	39,79	48,20±6,34
O	41,04	36,34	39,09	43,10	33,97	42,50	46,07	45,67	40,97±4,29
Ca	6,80	6,20	5,29	6,67	5,35	9,50	8,57	7,35	6,97±1,47
P	2,72	3,75	2,78	3,83	3,40	1,80	5,39	4,68	3,54±1,14
Ca/P	2,50	1,65	1,90	1,74	1,57	5,40	1,59	1,57	1,97±1,31
Ca/P (molar)	3,23	2,14	2,46	2,25	2,04	6,82	2,06	2,03	2,54±1,64

Nach der Dialyse zeigt sich in Tabelle 21, dass sich die Nanopartikel jetzt zu 42,68 % aus Kohlenstoff, 41,19 % aus Sauerstoff und zu 10,58 % aus Calcium sowie 4,70 % aus Phosphor zusammensetzen. Daraus resultiert ein Calcium/Phosphat-Verhältnis von 2,25.

Tabelle 21 - Charakterisierung der GDNT-CaP-Nanopartikel nach der Dialyse

EDX Auswertung nach der Dialyse (ohne zentrifugieren)								
nach Dialyse	1	2	3	4	5	6	7	Mittelwert
	wt%	wt%	wt%	wt%	wt%	wt%	wt%	wt%
C	57,89	59,49	27,79	28,31	28,43	49,78	47,05	42,68±14,22
O	37,74	35,60	42,66	45,67	50,27	33,61	42,78	41,19±5,89
Ca	2,93	3,05	19,89	17,44	14,65	8,06	8,03	10,58±6,81
P	1,44	1,86	9,66	8,58	6,65	2,56	2,14	4,70±3,49
Ca/P	2,03	1,64	2,06	2,03	2,20	3,15	3,75	2,25±0,75
Ca/P (molar)	2,63	2,13	2,66	2,63	2,85	4,07	4,86	2,25±0,97

Die Reinigung durch die Dialyse konnte den prozentualen Anteil der Probe an Calcium und Phosphor von 10,51 % auf 15,28 % erhöhen. Das Verhältnis zwischen Calcium und Phosphor stieg von 1,97 auf 2,25 % an, was aber aufgrund des hohen Fehlers (teilweise bis zu 85 %) der Messung als unverändert zu betrachten ist. Der Gehalt an

Kohlenstoff geht deutlich zurück, aber der Sauerstoffgehalt bleibt unverändert. Dies lässt sich durch die nach der Dialyse vorhandene Glycerin-Verunreinigung erklären, denn Glycerin hat einen hohen Sauerstoffanteil im Molekül. Dieser liegt berechnet über die Summenformel von $C_3H_8O_3$ bei 52,12 %. Der Kohlenstoffanteil liegt hingegen bei 39,13 %.

Ein großes Problem der Charakterisierung war die niedrige Konzentration an Nanopartikeln, denn ein 40-0,5-0,5er Ansatz lieferte ca. 0,5 mg Nanopartikel. Die Dialyse entfernte zwar die Gegenionen recht erfolgreich aus der Probenlösung, jedoch wurde die ausgewogene Masse durch die Dialyseprozedur ver Hundertfacht – also verunreinigt. Genaue Nachforschungen ergaben, dass diese starke Verunreinigung Glycerin ist, mit dem der trockene Dialyseschlauch stabilisiert wurde. Dies wurde über ein Gespräch mit dem Dialyseschlauchhersteller klar. Trotz aufwändiger Reinigung der Schläuche mit Ethanol und Wasser konnte dieses Problem nicht gelöst werden. Die Verunreinigung war von der Masse her ca. 10fach höher als die der Nanopartikel in der Probe. Vor der Dialyse ergab eine Probe ca. 0,15 mg Nanopartikelmasse. Nach der Dialyse betrug die Auswaage nach dem Abdampfen des Ethanols ca. 2 mg. Die Elementaranalyse und XRD-Untersuchungen scheiterten an der niedrigen Masse der Partikel. Neben den EDX-Untersuchungen wurden noch IR-Spektren des GDNT und der GDNT-CaP-Nanopartikel aufgenommen.

Werden die beiden in Abbildung 4.72 dargestellten IR-Spektren miteinander verglichen, so sind einige der gefundenen Banden bei beiden Spektren vorhanden (Tabelle 22). Dies gilt für die Peaks bei 3400, 2961/28, 2854, 1460, 1377, 1100, und 739 cm^{-1} . Diese charakterisieren das Lipid. Die Unterschiede zeigen sich anhand der restlichen Signale. Die Anwesenheit von Phosphat lässt sich durch die Banden bei 1269, 1070, 1038 und 548 cm^{-1} belegen. Das Lipid alleine zeigt im IR-Spektrum bei ca. 1050 cm^{-1} eine Bande, bei den Kolloiden sind dort drei Banden sichtbar.

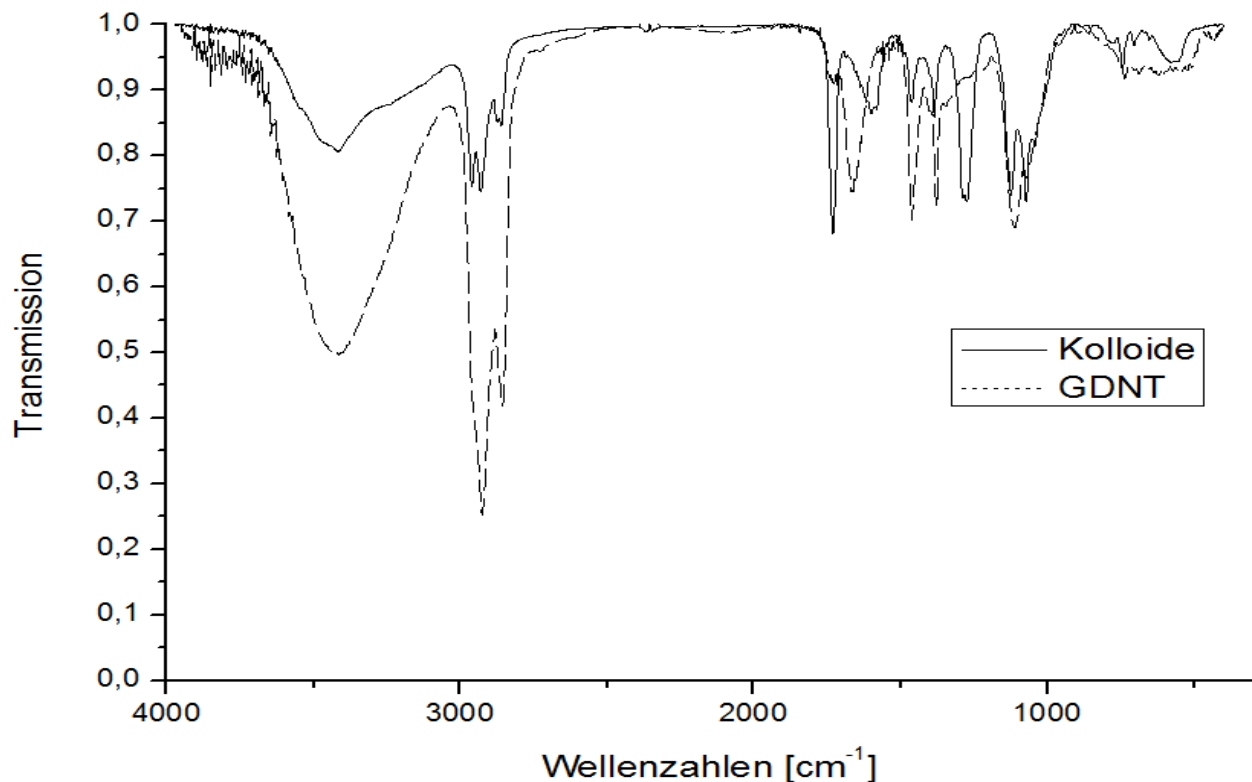


Abbildung 4.72 - IR-Diagramm von KBr-Presslingen des GDNT verglichen mit den CaP-GDNT-Kolloiden vor der Dialyse

Im IR-Spektrum (Abbildung 4.72) sind bei 1726 und 1580 cm^{-1} zwei Banden sichtbar, die nicht erwartet wurden. Es kann sein, dass sich Carbonat in das Calciumphosphat eingebaut hat. Daher sind auch Carbonsäure- bzw. Carbonat-Signale sichtbar. Diese könnten aber auch an einem Einbau von Lactationen liegen, die durch die Calciumlösung ins Reaktionsgeschehen eingebracht wurden. Allerdings steht die gute Löslichkeit von Calciumlactat dazu im Widerspruch.

Für die IR-Spektren ist es problematisch, alle Signale zweifelsfrei zu zuordnen, da sich manche Signale überlagern. Dies gilt speziell für den Bereich 1000-1150 und 1150-1500 cm^{-1} . Im ersten Bereich überlappen P-O-Alkyl (1050-1030 cm^{-1}) und C-O Valenzschwingung (1040 bis 1150 cm^{-1}). Im zweiten Bereich überlappen O-H Deformationsschwingung (1410-1260 cm^{-1}), symmetrische Deformationsschwingung der CH_3 -Gruppen (1390-1370 cm^{-1}), und P=O Schwingung (1250-1300 cm^{-1}).

Tabelle 22 - IR-Spektren des GDNT verglichen mit dem IR-Spektrum der GDNT-CaP-Nanopartikel

Auswertung des IR-Spektrums ^[91,104]				
	GDNT	GDNT-CaP-Kolloid	Gruppe	Schwingungstyp
cm ⁻¹				
3400	ja	ja	O-H	H ₂ O
2961/2928	ja	ja	CH ₂ / CH ₃	
2854	ja	ja	CH	
1726	nein	ja	R-COOH	Carbonat / Lactat
1653	ja	nein	Wasser	
1580	nein	ja	COO-	Carbonat / Lactat
1460	ja	ja	CH ₂ / CH ₃ / OH	Deformation
1377	ja	ja	CH ₃	sym. Deformation
1269	nein	ja	P=O / O-H	Valenz / Deformation
1100	ja	ja	C-O-C / C-OH	Valenz
1070	nein	ja	P-O-Alkyl / C-O	
1038	nein	ja	P-O-Alkyl / C-O	
739	ja	ja	CH ₂	<i>rocking</i> Schwingung
548	ja	ja	P-O	

4.5.3.1 Zusammenfassung der Reinigung und Charakterisierung der Nanopartikel

Die Reinigung der Nanopartikel in Ethanol hergestellt, gestaltete sich aufgrund der niedrigen Masse eines Ansatzes als schwierig. Eine Filtration im herkömmlichen Sinne ist nicht möglich, da ein doppelter Standard-GDNT Ansatz nur rund 0,5 mg Nanopartikel enthielt. Das Eindampfen der Lösungen hatte immer das Problem, dass sich dann Agglomerate bildeten und die stabilen Proben ausfielen. Da handelsübliche Tischzentrifugen nicht in der Lage sind, ca. 50 nm große Nanopartikel abzutrennen, war es nötig eine, Ultrazentrifuge zu verwenden. Bei 120 min langer Zentrifugation bei 15.000 U min⁻¹ blieben die Partikel stabil. Jedoch konnten die Partikel nicht redispergiert werden. Das Ultraschallbad zerstörte die Nanopartikel auch bei Behandlungszeiten von unter einer Minute, was die Agglomerate aber auch nicht zerstörte. Somit wurden die Partikel über Dialyse gereinigt. Es stellte sich als optimal und reproduzierbar heraus, 5 mL eines Ansatzes mit 2x 900 mL Ethanol für je 2 h zu dialysieren. Die Ultraschallbehandlung der nicht dialysierten Partikel konnte die Ergebnisse ebenfalls verbessern. Die Partikel wurden 1 min lang im Ultraschallbad

behandelt und dann dialysiert. Hier konnten dann im REM neben den beim Trocknen agglomerierten Partikeln auch sehr viele einzelne Partikel gefunden werden. Die überschüssigen Ionen aus Herstellung und pH-Wert Einstellung sowie nicht verbrauchte Lipidreste konnten erfolgreich herausgewaschen werden, aber durch die Schläuche wurde Glycerin in die Probe eingeschleppt. Dieses Problem konnte auch durch mehrere Waschschriffe der Schläuche vor der Dialyse nicht gelöst werden. Die Masse der Probe betrug vor der Dialyse ca. 0,5 mg. Nach der Dialyse ergaben sich stark schwankende Massen von 1 bis 2 mg. Somit sank der Anteil der Nanopartikel auf 25 % bis 50 %. Der Rest der Masse bestand aus Glycerin, also 50 % bis 75 %. Es ist auch zu beachten, dass die überschüssigen Ionen und Lipidreste entfernt wurden, daher ist der Glycerinanteil der Auswaage sogar noch höher.

Die Charakterisierung der Nanopartikel konnte über EDX und IR belegen, dass sich die Nanopartikel aus Calciumphosphat und Lipid zusammensetzen. Nach dem EDX konnte die Dialyse den anorganischen Anteil von 10 auf 15 % erhöhen, was eine Verbesserung von 50 % bedeutet. Auf Grund der Anwesenheit von Glycerin ist der prozentuale Anteil an organischer Substanz immer noch sehr hoch.

Da die Nanopartikel jetzt stabilisiert, charakterisiert und die Darstellung reproduzierbar ist, kann eine Funktionalisierung erfolgen.

4.6 Funktionalisierung der Calciumphosphat-GDNT-Kolloide

Die in Kapitel 4.5 synthetisierten Calciumphosphat-GDNT-Nanopartikel wurden nach der erfolgreichen Stabilisierung und Reproduzierbarkeit auch charakterisiert. Die Funktionalisierung erfolgte über Lysozym, BSA und Ubiquitin.

Die Standard-GDNT-Probe wurde hierzu nach der Dialyse mit einer Proteinlösung versetzt. Diese musste allerdings in wässriger Lösung zugegeben werden, da die Löslichkeit der Proteine in Ethanol deutlich unter 1 g L^{-1} lag. Nach der Dialyse einer Standard-GDNT Probe wurde die Probe in mehrere 5 mL-Volumina aufgeteilt. Diese 5 mL wurden mit je 0,1 / 0,2 / 0,3 / 0,4 / 0,5 mL einer wässrigen Lösung des Proteins (1 g L^{-1}) versetzt. Jedes dieser Volumina ergab eine Probe der Proteinreihen. Nach der Proteinzugabe wurden die Proben zusammen 10 min auf der Mehrfachrührplatte gerührt. Es folgten danach Untersuchungen mit dynamischer Lichtstreuung. Die Proteine blieben trotz ihrer niedrigen Löslichkeit in Ethanol in der Probe gelöst, was auf

die Verdünnung zurückzuführen ist. Erst nach den unten beschriebenen Zeiten kam es zur Ausbildung von Niederschlägen.

4.6.1 Funktionalisierung der Calciumphosphat-GDNT-Kolloide mit BSA

Die BSA-Reihe ergab in der dynamischen Lichtstreuung nach 10 min Rühren eine starke Verkleinerung der Partikel. Die mittlere Größe der Partikel war von 215 nm auf 150 bis 170 nm gesunken. Nur bei der 0,5 mL BSA-Probe war der hydrodynamische Radius mit 250 nm größer. Die Qualität der Messungen blieb gut, denn der PDI änderte sich kaum und blieb bei ~0,2. Für die Proben mit 0,4 und 0,5 mL BSA stellte sich nach 2 Tagen eine Destabilisierung mit angeschlossener Sedimentation ein. Die Proben mit der niedrigeren BSA-Menge ergaben für längere Zeit stabile Dispersionen. Abbildung 4.73 zeigt die BSA-Proben mit den zugegebenen BSA-Volumina von 0,1 / 0,2 / 0,3 mL. Diese zeigten die längste Stabilisierungsdauer. Diese Proben wurden direkt nach dem Rühren gemessen und zeigten alle drei einen kleineren hydrodynamischen Radius als die Blindprobe der Nanopartikel (Record 24). Dies bedeutet, dass eine Anlagerung stattgefunden hat. Das Protein hat sich auf der Oberfläche des Calciumphosphat-GDNT-Nanopartikels angelagert und die Lipidschicht komprimiert, oder sich in die Lipidschicht eingelagert.

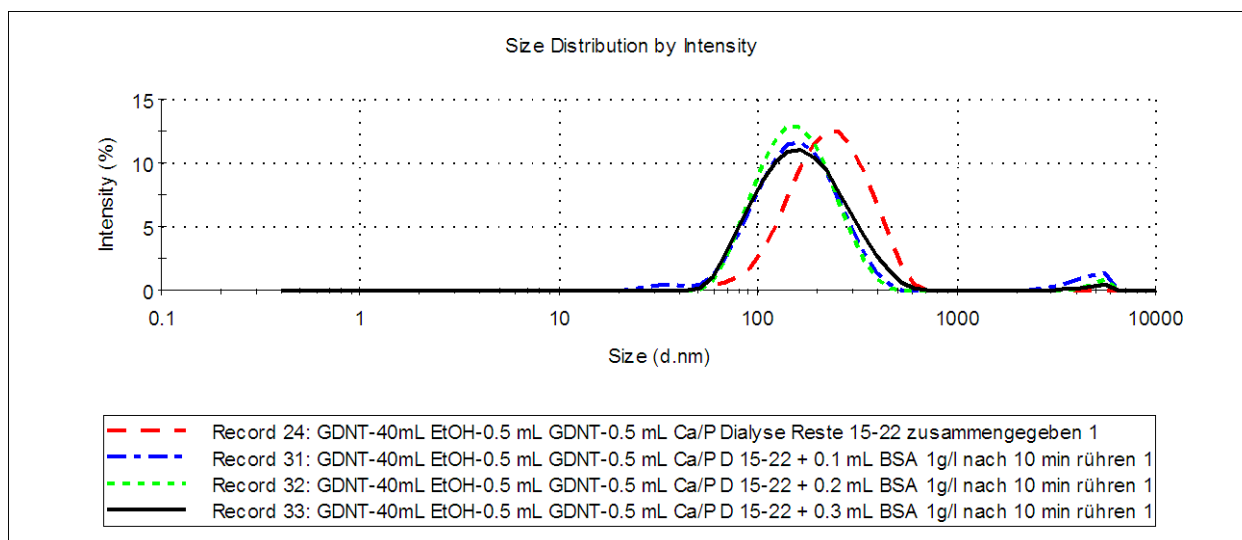


Abbildung 4.73 - Calciumphosphat-GDNT-Nanopartikel mit BSA-Lösung, 10 min nach der Funktionalisierung

Die Proben blieben auch nach 2 Tagen stabil und der PDI immer noch gut (Abbildung 4.74). Die Peakbreite der funktionalisierten Nanopartikel hat jedoch zugenommen, was

4 Ergebnisse und Diskussion

4.6 Funktionalisierung der Calciumphosphat-GDNT-Kolloide

eine einsetzende Destabilisierung andeutet. Nach rund zwei Wochen wurden die Partikel erneut gemessen.

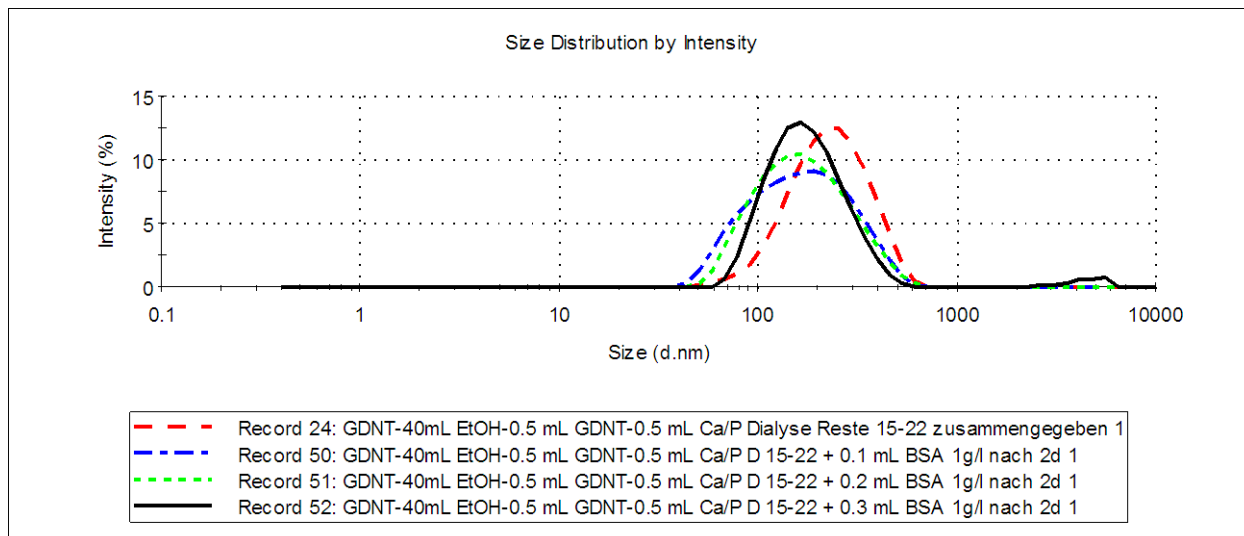


Abbildung 4.74 - Calciumphosphat-GDNT-Nanopartikel mit BSA-Lösung, zwei Tage nach der Funktionalisierung

In der folgenden Abbildung 4.75 stellte sich heraus, dass die 0,2 mL Probe mit über 15 Tagen die längste Stabilisierung der Nanopartikel ermöglicht hat. Die Probe mit 0,1 mL Protein ist nach der DLS wegen großer oder sedimentierender Partikel nicht mehr zuverlässig messbar. Die Probe mit 0,3 mL BSA zeigte eine starke Verbreiterung des Größenpeaks mit einer Zunahme des Maximums von 170 nm auf 215 nm.

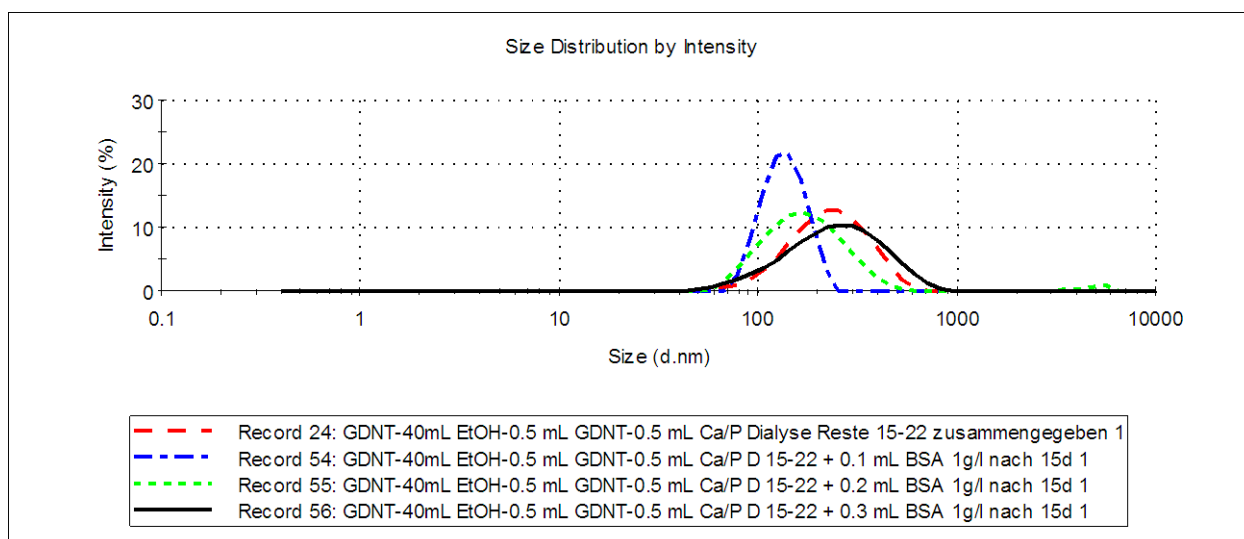


Abbildung 4.75 - Calciumphosphat-GDNT-Nanopartikel (in Ethanol) mit wässriger BSA-Lösung, 15 Tage nach der Funktionalisierung

4.6.2 REM-Bilder der Funktionalisierungsreihe der Calciumphosphat-GDNT-Kolloide mit BSA

Die REM-Aufnahmen der BSA-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel zeigen und bestätigen die Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung. Die Proben mit 0,1 und 0,2 mL BSA Zugabe zeigen unter 100 nm Nanopartikel, wohingegen die Proben mit 0,3 mL BSA sehr stark verwachsene und deutlich größere Partikel zeigen.

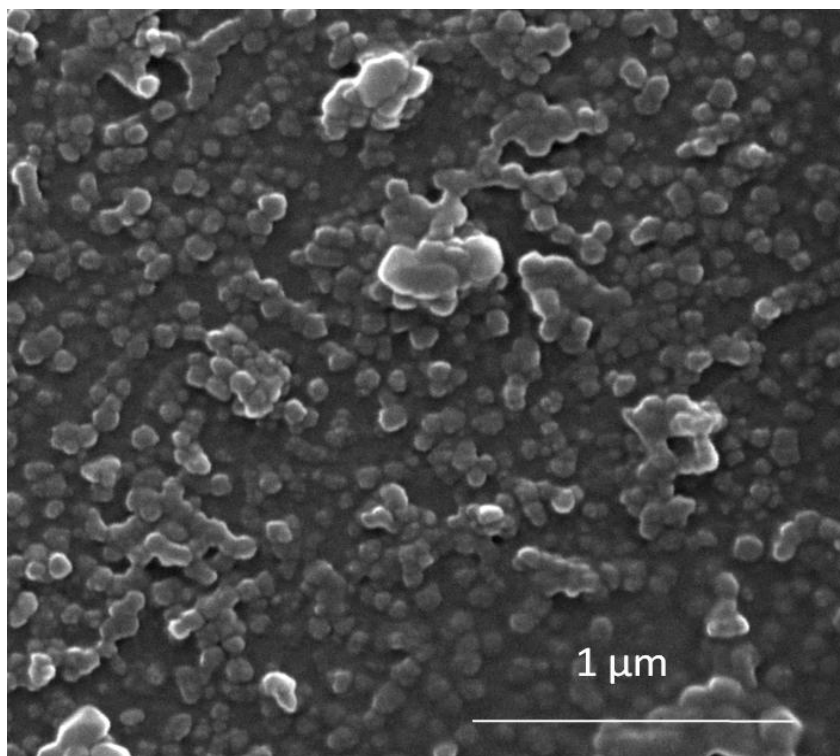


Abbildung 4.76 - REM-Aufnahme der Nanopartikel funktionalisiert mit 0,1 mL BSA-Lösung direkt nach der Fällung.

Proben mit 0,4 und 0,5 mL BSA zeigen keine Nanopartikel mehr. Abbildung 4.76 zeigt ein REM-Bild der Probe mit 0,1 mL BSA direkt nach der Herstellung. Die gesamte Probe zeigte, dass die Nanopartikel durch einen Proteinfilm bedeckt sind. Die Partikel sind hauptsächlich 50 bis 60 nm groß. Die Größenverteilung ist wesentlich monodisperser als die der nicht funktionalisierten Nanopartikel. Wenige Partikel sind größer oder liegen agglomeriert vor. Die meisten Partikel sind nicht vernetzt und liegen separiert vor. Die Abbildung 4.77 zeigt die Nanopartikel nach 21 Tagen. Sie sind noch immer vorhanden, aber deutlich mehr verwachsen. Die Stabilisierung ist noch über 15 Tage hinaus möglich, wie es die dynamische Lichtstreuung zeigte. Die REM-Aufnahme entstand aus dem Überstand der Probe, denn nach 15 Tagen kam es zwar

zur Sedimentation, aber im Überstand waren immer noch dieselben kleinen nicht verwachsenen Nanopartikel zu finden.

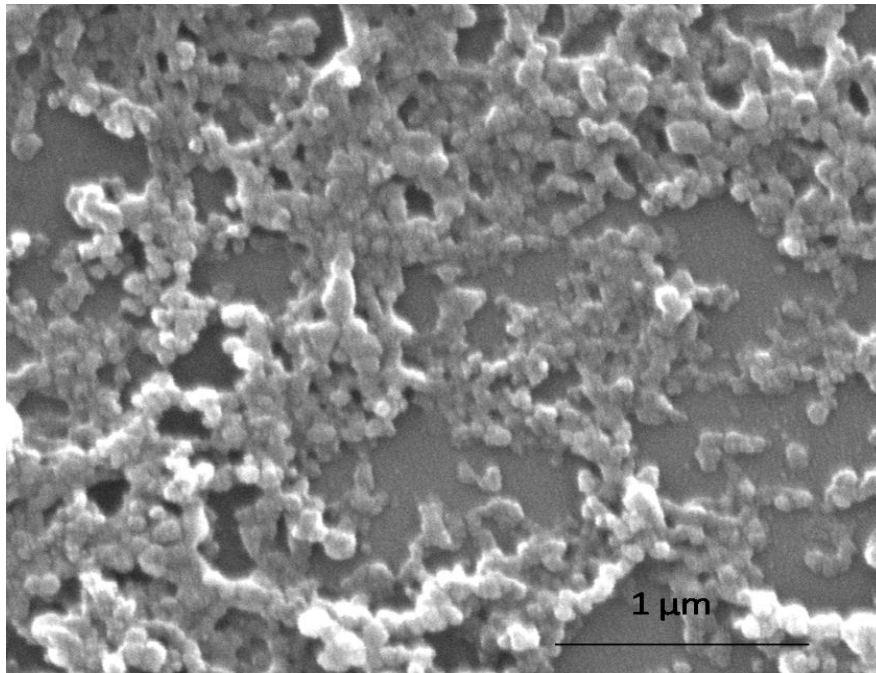


Abbildung 4.77 - REM-Aufnahme der Nanopartikel funktionalisiert mit 0,1 mL BSA-Lösung nach 21 Tagen.

Abbildung 4.78 zeigt eine REM-Aufnahme der Calciumphosphat-GDNT-Nanopartikel funktionalisiert mit 0,3 mL BSA-Lösung direkt nach der Fällung. Hier zeigt sich, dass die Nanopartikel in ein dichtes Netzwerk integriert sind. Auf dem Probenträger sind keine einzelnen Nanopartikel zu sehen. Hier liegt die Erklärung nahe, dass das BSA sich in die Lipidschicht einbauen kann. Ist zu viel Protein vorhanden, bildet es in Lösung Agglomerate aus, die auch die Nanopartikel einschließen und sich zusammenlagern. Ausgehend von einer Ausbeute von ~0,5 mg eines 40 mL Standard-GDNT-Ansatzes sind in den zur Funktionalisierung verwendeten 5 mL ca. 0,0625 mg Nanopartikel vorhanden. Die Funktionalisierung war erfolgreich.

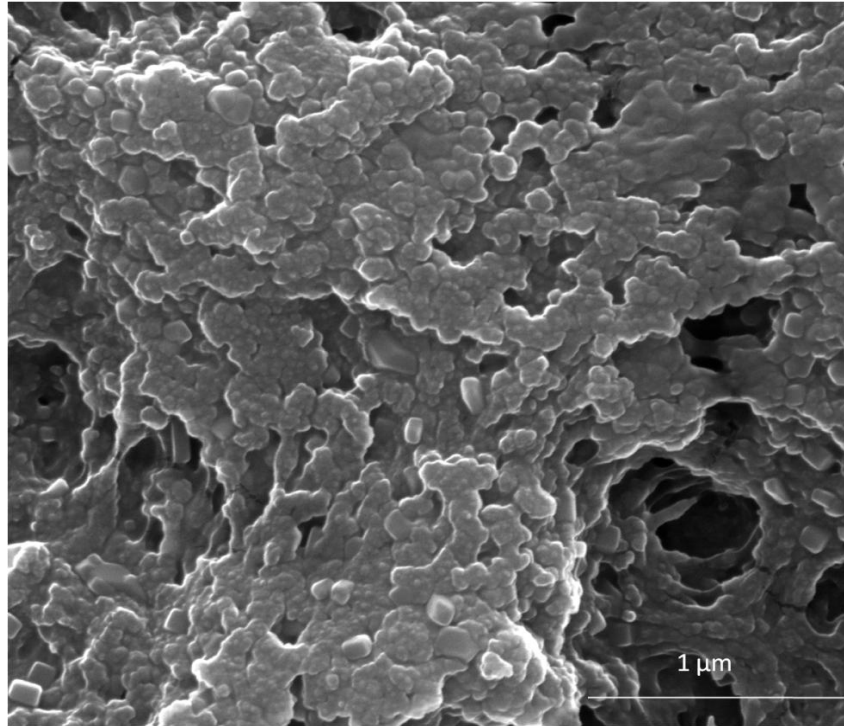


Abbildung 4.78 - REM-Aufnahme der Calciumphosphat-GDNT-Nanopartikel, funktionalisiert mit 0,3 mL BSA-Lösung direkt nach der Fällung.

4.6.3 Funktionalisierung der Calciumphosphat-GDNT-Kolloide mit Lysozym

Für die Lysozym-Reihe ergab sich in der dynamischen Lichtstreuung nach 10 min Rühren eine Vergrößerung der Partikel. Allerdings wurden die eingesetzten Nanopartikel vor der Dialyse für 1 min im Ultraschallbad behandelt, daher war die Ausgangsgröße viel kleiner. Die mittlere Größe der Partikel betrug 168 nm und wurde auf 190 bis 270 nm erhöht, was bedeutet, dass sich das Protein sehr wahrscheinlich nicht oder nur schlecht in die Lipidschicht einlagern kann. Der PDI der Messungen war nicht mehr so gut, was auch darauf hinweist, dass das Protein agglomeriert und sich nicht ausschließlich an oder in die Partikel lagert. Die Proben blieben aber deutlich länger stabil als die mit BSA funktionalisierten Proben. Diese Messreihe wurde über 46 Tage beobachtet. Wie bei der BSA-Reihe auch stellten sich die Proben mit niedrigen Proteinvolumina als stabiler heraus.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.6 Funktionalisierung der Calciumphosphat-GDNT-Kolloide

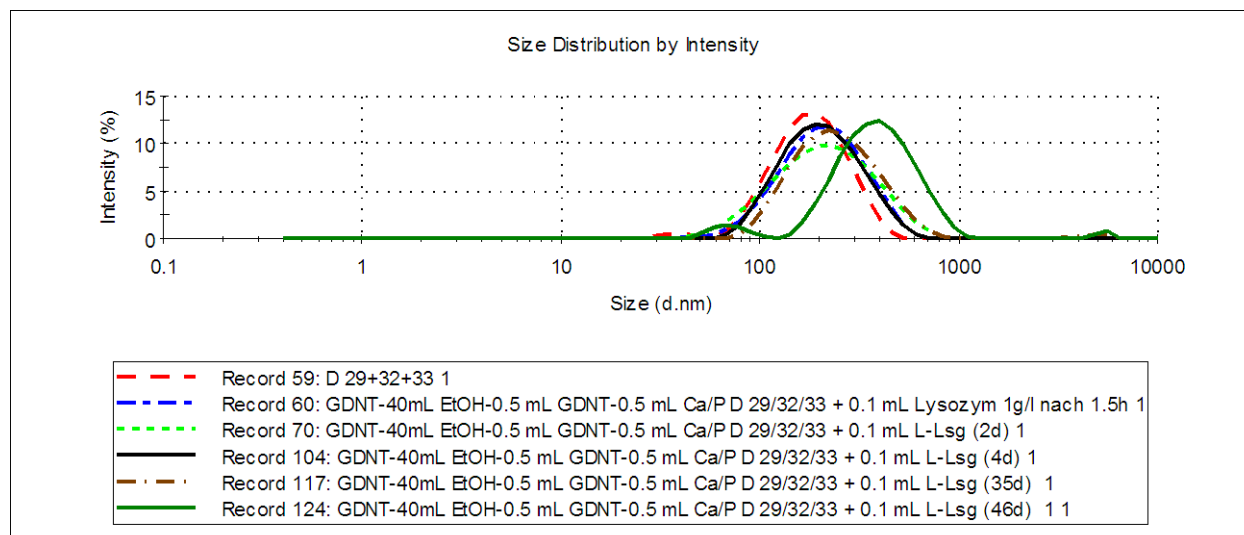


Abbildung 4.79 - Calciumphosphat-GDNT-Nanopartikel mit 0,1 mL Lysozym-Lösung funktionalisiert

In Abbildung 4.79 ist zu erkennen, dass die Partikel bis zu einem Alter von 35 Tagen kaum eine Veränderung der Größenverteilung zeigen. Der hydrodynamische Radius der Nanopartikel steigt im Mittel nach der Zugabe auf 200 nm, ist dann aber konstant. Die Probe nach 46 Tagen zeigt eine deutliche Zunahme des Radius, also setzt die Destabilisierung, wenn auch langsam, ein.

Abbildung 4.80 zeigt, dass die Partikel mit einer Zugabe von 0,2 mL Lysozym über 46 Tage stabil sind. Das Maximum des hydrodynamischen Radius steigt innerhalb des Beobachtungszeitraums kontinuierlich an. Die Peakbreite nimmt zu und verhält sich daher umgekehrt proportional zur Aussagekraft und Qualität der Messung, welche abnimmt.

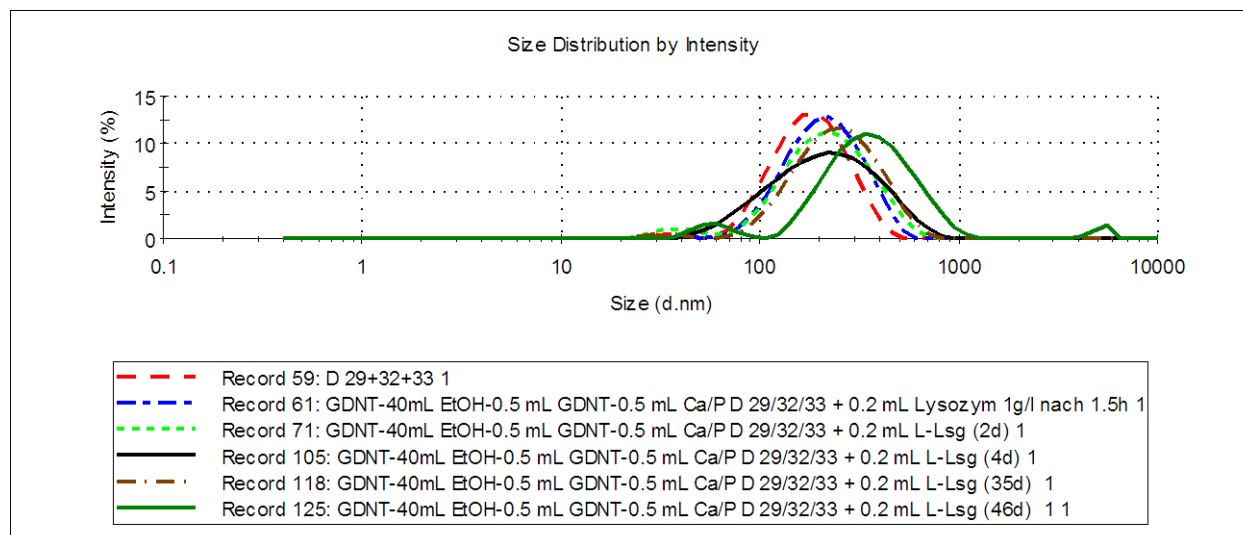


Abbildung 4.80 - Calciumphosphat-GDNT-Nanopartikel mit 0,2 mL Lysozym-Lösung funktionalisiert

4.6.4 REM-Bilder der Funktionalisierungsreihe der Calciumphosphat-GDNT-Kolloide mit Lysozym

Die REM-Aufnahmen der mit Lysozym funktionalisierten Calciumphosphat-GDNT-Nanopartikel bestätigen die Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung. Die Proben mit 0,1 und 0,2 mL Lysozym zeigen nach der Zugabe Nanopartikel. Die Proben mit mehr Proteinzugabe zeigten keine Nanopartikel mehr. Die Partikel sind unter einer Proteinschicht verschwunden und nicht mehr sichtbar oder vorhanden.

In Abbildung 4.81 sind kleine Nanopartikel zu sehen, die leicht vernetzt sind. Sie sind ähnlich monodispers wie die nicht funktionalisierten Nanopartikel. Die Größe liegt zwischen 45 und 120 nm. Auch bei der Lysozym-Reihe konnten die Nanopartikel erfolgreich funktionalisiert werden. Die Partikel sind allerdings stärker verwachsen als es bei der BSA-Funktionalisierung der Fall war. Es hat den Anschein, dass das Protein nicht so gut in die Lipidschicht eindringen kann, wie vermutet, und sich daher auf der Oberfläche anlagert und leichter vernetzt. Proben, die zu einem späteren Zeitpunkt als direkt nach der Herstellung für das REM vorbereitet wurden, zeigten dort keine Nanopartikel mehr. Sie verhalten sich ähnlich wie die Proben mit mehr als 0,2 mL Proteinlösungszugabe. Die Partikel sind unter einer Proteinschicht verschwunden und nicht mehr sichtbar.

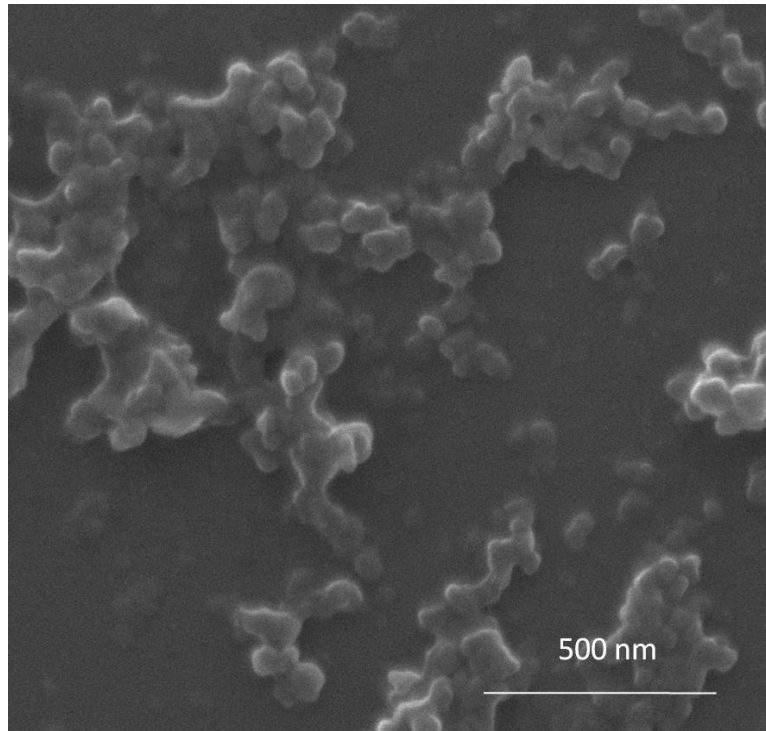


Abbildung 4.81 - REM-Aufnahme der Calciumphosphat-GDNT-Nanopartikel funktionalisiert mit 0,1 mL Lysozym-Lösung (direkt nach Rühren)

4.6.5 Funktionalisierung der Calciumphosphat-GDNT-Kolloide mit Ubiquitin

Für die Ubiquitin-Reihe ergab sich in der dynamischen Lichtstreuung nach 10 min Rühren eine Vergrößerung der Partikel. Es wurde dieselbe Nanopartikel-Probe verwendet wie bei der Lysozym-Reihe. Diese wurde vor der Dialyse 1 min im Ultraschallbad behandelt. Daher betrug die mittlere Größe der Nanopartikel in Lösung 168 nm. Die Ubiquitin-Proben zeigten bei den drei verwendeten Proteinen die am wenigsten ausgeprägte Stabilisierung der Nanopartikel. Alle Proben agglomerierten innerhalb der ersten vier Tage. Dies deutet darauf hin, dass das Protein in Ethanol schnell agglomeriert und sich nur sehr schlecht an oder in die Partikel lagern kann. Die Proben mit den niedrigen Proteinvolumen zeigten wieder die besten Ergebnisse. Die Proben mit 0,1 und 0,2 mL Proteinlösungszugabe ergaben in der dynamischen Lichtstreuung nahezu deckungsgleiche Größenverteilungen, daher wird nur die 0,1 mL Probe dargestellt. Abbildung 4.82 zeigt, dass die Partikel über 2 Tage stabil bleiben und dann nach 4 Tagen das Maximum der Größenverteilung stark zunimmt. Es liegt bei über 300 nm.

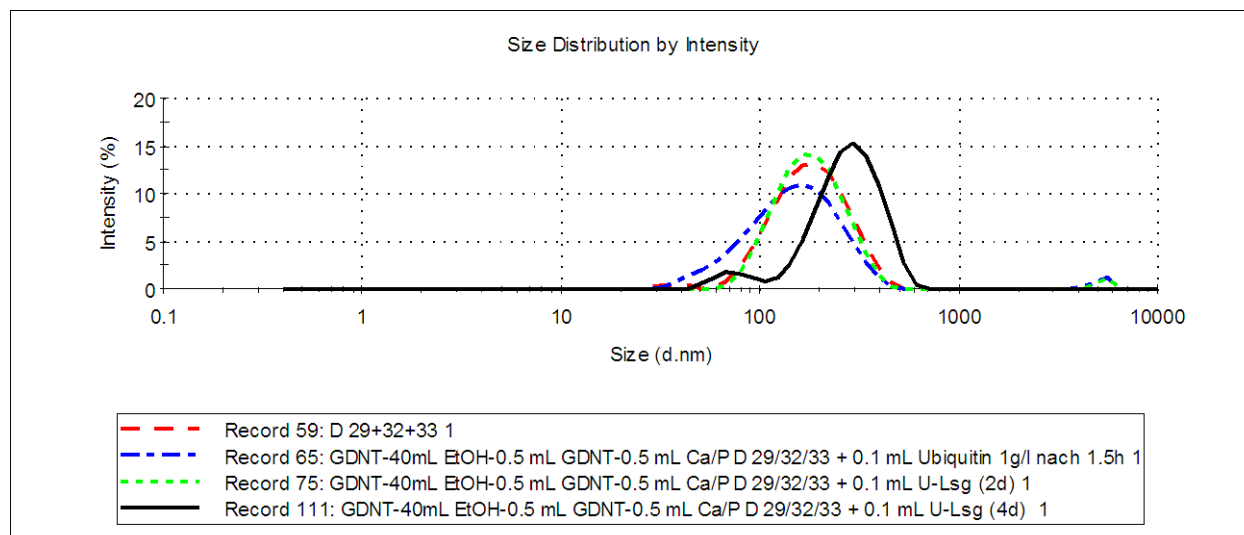


Abbildung 4.82 - Calciumphosphat-GDNT-Nanopartikel mit 0,1 mL Ubiquitin-Lösung funktionalisiert

4.6.6 REM-Bilder der Funktionalisierungsreihe der Calciumphosphat-GDNT-Kolloide mit Ubiquitin

Die REM-Aufnahmen der Calciumphosphat-GDNT-Nanopartikel funktionalisiert mit Ubiquitin zeigen auch, dass die Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung exakt sind, so weit es für die Methode möglich war. Die Proben zeigten bei niedriger Proteinkonzentration nur sehr schwach verwachsene Nanopartikel. Die Morphologie der REM-Proben lässt keine exakte Aussage zu, aber es wirkt so, als bedecke das Protein die Nanopartikel.

Eine Wechselwirkung zwischen den Nanopartikeln und Ubiquitin ist nur sehr gering ausgebildet, denn die anderen Proteinproben mit Lysozym und BSA zeigen im Vergleich bei einer so niedrigen Proteinkonzentration noch sehr viele nicht verdeckte Nanopartikel. Also kann hier postuliert werden, dass die Partikel nur verdeckt werden und sich das Protein nicht an die Partikel anlagert. Abbildung 4.83 zeigt die Calciumphosphat-GDNT-Nanopartikel-Probe mit 0,1 mL Ubiquitin-Lösung, aufgenommen direkt nach der Fällung. Bei den Proben, die später als direkt nach der Fällung für das REM vorbereitet wurden, zeigten sich kaum noch Nanopartikel – auch nicht im Überstand nach der Sedimentation.

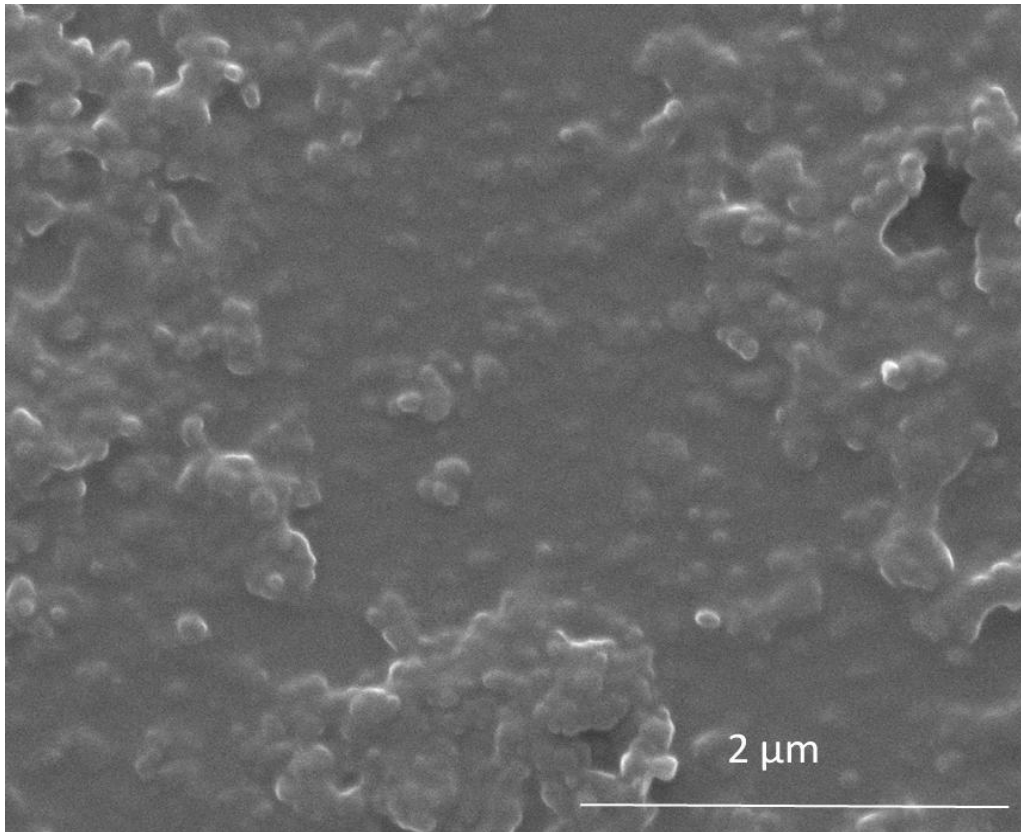


Abbildung 4.83 - REM-Aufnahme der Calciumphosphat-GDNT-Nanopartikel funktionalisiert mit 0,1 mL Ubiquitin-Lösung.

4.6.7 Reinigung der funktionalisierten GDNT-CaP-Nanopartikel

Die BSA- und Lysozym-Reihen ergaben mit der Probenzusammenstellung 5 mL durch Dialyse gereinigte Nanopartikeldispersion und der Zugabe von 0,1 mL einer 1 g L^{-1} Proteinlösung eine erfolgreiche Funktionalisierung der Nanopartikel. Diese Ergebnisse wurden reproduziert. Es wurden ein-, zwei- und dreifache Ansätze dieser Proben hergestellt und exakt wie die GDNT-CaP-Nanopartikel vor der Funktionalisierung dialysiert. Vor der Dialyse zeigten die zwei- und dreifachen Ansätze nahezu identische DLS-Ergebnisse wie die einfach-Ansätze. Für BSA konnte so ein großer Teil des überschüssigen Proteins durch die Dialyse entfernt werden, die Nanopartikel wurden im REM besser sichtbar. Dies ist das einzige Indiz für eine erfolgreiche Reinigung. Die Stabilität der BSA-Partikeldispersion nach der Dialyse betrug jedoch weniger als einen Tag. Die mit Lysozym versetzten Proben hingegen überstand die Dialyse besser, jedoch war der Reinigungserfolg wesentlich geringer. Das Protein ist nicht in der Lage, den Dialyseschlauch zu verlassen. Die dynamische Lichtstreuung diente hier als Nachweis der noch vorhandenen Nanopartikel und der einsetzenden Sedimentation. Es bleibt aber auch hier zu berücksichtigen, dass nach der Dialyse der GDNT-CaP-

Nanopartikel vor der Proteinzugabe ein hoher Anteil an Glycerin in die Probe eingebracht wurde. Da jedoch alle drei Proteine am REM unterschiedlich ausgeprägte Morphologien der Nanopartikel aufwiesen, kann ein starker Einfluss des Glycerins ausgeschlossen werden.

4.6.8 Abschätzung der Beladung der GDNT-CaP-Nanopartikel mit den Proteinen

Hier werden die in Kapitel 4.2.6 angenommenen Werte für die Proteine beibehalten, genau wie die Berechnungsgrundlagen.

Die mit BSA funktionalisierten GDNT-CaP-Nanopartikel zeigten im REM bei 0,1 mL BSA-Zugabe einen Radius von 25 bis 30 nm. Daraus folgt eine 14,08 % ausgebildete Monolage oder eine 17,93 % statistische Beladung der Partikel. Bei der Zugabe von 0,3 mL bildeten sich bereits stark verwachsene Aggregate. Die zugegebene BSA-Menge wäre hier aber nur für eine zu 42,24 % ausgebildete Monolage ausreichend.

Die mit Lysozym funktionalisierten GDNT-CaP-Nanopartikel zeigten im REM bei 0,2 mL Lysozym-Zugabe einen Radius von 12,5 bis 60 nm. Daraus folgt eine 2,64 % bis 12,67 % ausgebildete Monolage oder eine 3,37 % bis 16,17 % statistische Beladung der Partikel. Bei einer höheren Proteinmengenzugabe kam es zum Ausflocken der Partikel.

Die mit Ubiquitin funktionalisierten GDNT-CaP-Nanopartikel zeigten im REM bei 0,1 mL Ubiquitin-Zugabe einen Radius von ca. 70 nm, welche allerdings nur sehr schwer zu erkennen sind. Auch sind die Partikel sehr verwachsen, daher dient der Wert nur als ganz grobe Näherung. Daraus folgt eine 7,4 % ausgebildete Monolage oder eine 9,43 % statistische Beladung der Partikel. Bei einer höheren Proteinmengenzugabe kam es zum Ausflocken der Partikel.

Die Beladung der Nanopartikel durch die Proteine ist niedrig, höhere Proteinkonzentrationen führten allerdings zur Destabilisierung des Systems, wie es in den vorherigen Kapiteln beschrieben wurde. Es ist allerdings zu beachten, dass der Fehler dieser Berechnungen sehr hoch ist, da alleine das Molekulargewicht des Proteins und die daraus resultierende Größe nicht exakt bekannt sind. Auch können die Proteine nicht globulär vorliegen, sondern eher länglich, und somit eine größere Oberfläche haben. Andererseits sind wahrscheinlich nicht alle Proteine an Nanopartikel angelagert.

4.6.9 Zusammenfassung der Funktionalisierung der Calciumphosphat-GDNT-Kolloide mit BSA, Lysozym und Ubiquitin

Die Calciumphosphat-GDNT-Nanopartikel konnten mit BSA funktionalisiert werden. Dieses Protein kann sich vermutlich gut in die Lipidschicht einlagern, so dass es nur sehr langsam zur Agglomeration der Nanopartikel über das Protein kommt. Die Partikel sind monodisperser als die nicht funktionalisierten Nanopartikel. Ihre Größe liegt zwischen 50 und 60 nm und der Grad der Verwachsung ist sehr gering. Die Ergebnisse sind reproduzierbar und auch eine Reinigung über Dialyse konnte erfolgreich durchgeführt werden. Jedoch betrug die Stabilität der gereinigten Partikel weniger als einen Tag.

Lysozym zeigt ähnliche Ergebnisse, jedoch sind die Nanopartikel nicht kleiner und auch die Größe der Partikel variiert stärker als die der nicht funktionalisierten Nanopartikel. Spekulativ betrachtet könnte es eine Erklärung dafür sein, dass Lysozym nur noch begrenzt in der Lage ist, sich in die Lipidschicht einzulagern, und sich daher eher auf der Nanopartikeloberfläche anlagert. Die Ergebnisse sind ebenfalls reproduzierbar und auch eine Reinigung über Dialyse erfolgte, jedoch scheint das Protein nicht durch den Dialyseschlauch zu diffundieren, da die REM-Bilder vor und nach der Dialyse nahezu identisch aussehen. Die Stabilität der gereinigten Partikel lag bei ca. einer Woche.

Ubiquitin ist nicht in der Lage, sich in die Lipidschicht einzulagern, und führt schon direkt nach dem Vermischen der Kolloid-Dispersion zu Agglomeraten, obwohl noch Nanopartikel im REM sichtbar waren.

Der Einfluss des Lösungsmittels auf die Proteine scheint hier eine wichtige Rolle zu spielen, denn die Proteine waren in Ethanol nur sehr schlecht löslich, daher wurden sie in wässriger Lösung zugegeben. Die 5 mL der Kolloid-Dispersion wurden jedoch in Ethanol vorgelegt und dort die wässrige Lösung von 0,1 bis 0,5 mL zugegeben. Es scheint sich bei Lysozym und Ubiquitin die mangelnde Löslichkeit nach kurzer Zeit auszuwirken, so dass die Proteine agglomerieren und die Nanopartikel auch ausflocken. Nur BSA scheint besser löslich zu sein, daher fällt dieses Problem hier nicht ins Gewicht.

Genauere Aussagen können aber nur getroffen werden, wenn die Reihen reproduziert und charakterisiert werden. Aufgrund der erschwerten Charakterisierung eines Standard-GDNT Ansatzes wird deutlich, dass die 5 mL der Protein-Proben eine noch

größere Herausforderung darstellen. Eine effizientere Reinigung dieser erstellten Partikel muss vor der Charakterisierung erfolgen. Wenn eine Zentrifugation der Partikel nicht möglich ist, sollte wieder die Dialyse genutzt werden. Hier können die bisher verwendeten Dialyseschläuche aber nicht genutzt werden, da der MWCO die Proteine nicht in allen Fällen durchlassen würde. Auch das Problem mit der Anwesenheit des Glycerin müsste gelöst werden, um die Reinigung noch zu verbessern.

Eine andere Alternative wäre, das Lipid so zu modifizieren, dass eine stabilere Bindung zwischen Calciumphosphat und Lipid möglich ist. Dies wurde auch getestet, denn im folgenden Kapitel werden die Versuche beschrieben, die mit einer phosphorylierten GDNT-Fraktion durchgeführt wurden. Die zusätzlichen Phosphatgruppen sollten auf der einen Seite die Löslichkeit des Lipides deutlich verbessern, so dass es vielleicht sogar in Wasser löslich ist. Aus der anderen Seite sollten die Phosphat-Gruppen das Anlagern des Lipides verbessern. Kapitel 4.7 beschreibt die Charakterisierung des Lipides und 4.8-4.10 die Experimente, die durchgeführt wurden.

4.7 Charakterisierung der phosphorylierten Tetraetherlipid-Fraktion

Die in der Arbeit verwendete phosphorylierte Lipidfraktion wurde wie in Kapitel 3.5.4.3 beschrieben aus der GDNT-Fraktion erstellt. Diese wurde mit POCl_3 umgesetzt. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde über Dünnschichtchromatografie betrachtet. Das GDNT ist die unpolarste Fraktion und läuft daher in polaren Lösungsmitteln relativ langsam. Hier wurde festgestellt, dass drei Fraktionen entstehen und das GDNT vollständig umgesetzt wird. Problematisch wird eine Aussage zur exakten Struktur des Lipides, denn das Bilden von drei Fraktionen bedeutet, dass entweder die Position der Phosphatgruppen nicht identisch ist und somit die Polarität unterschiedlich ist, oder das GDNT jetzt unterschiedliche Anzahlen an Phosphatgruppen besitzt. Im Folgenden wird diese neue Lipid Fraktion als GDNT-P bezeichnet.

4.7.1 MS-Untersuchung

Die Untersuchungen im Massenspektrum sollen belegen, ob die Anzahl der Phosphat-Gruppen identisch ist. Dann sollte das Massenspektrum, wie beim GDNT auch, drei Strukturen zeigen. Die Reaktionsprodukte sollten eine Molmassenzunahme von ein bis drei mal $77,95 \text{ g mol}^{-1}$ haben:

Bei vollständiger Umsetzung der drei Isomere wäre also kein Signal mehr bei m/z 1454 / 1456 / 1458 (Lipid ohne Na^+) oder m/z 1477 / 1479 / 1481 (GDNT mit Na^+) zu finden. Die Position und Anzahl der 5er-Ringe sollte nichts mit der Reaktionsfähigkeit des Lipides bei der Reaktion zu tun haben. Daher werden die Produktpeaks von allen Isomeren erwartet und sollten bei m/z 1555 / 1557 / 1559, m/z 1633 / 1635 / 1637 und m/z 1711 / 1713 / 1715 erscheinen. Die folgende Tabelle 23 zeigt die Auflistung der dem Massenspektrum entnommenen m/z -Werte und ordnet ihnen Strukturen zu.

Das Massenspektrum (Abbildung 4.85) belegt, dass die Phosphorylierung abgelaufen ist. Jedoch lässt sich aus dem Spektrum, unter Berücksichtigung der vorhandenen Isotope der entsprechenden Elemente ablesen, dass der GDNT 1x bis 3x, 5x und 7x phosphoryliert wurde. Neben diesen Signalen sind noch zahlreiche andere Signale in diesem Bereich zu finden. Dies kann entweder mit einer Fragmentierung des Moleküls erklärt werden oder mit der Anwesenheit von unbekannten Verunreinigungen und Reaktionsrückständen. Ein paar Signale konnten über die vermutete Anlagerung diverser Ionen aufgeklärt werden, andere sind zurzeit nicht aufgeklärt. Die Phosphat-

gruppen können unterschiedliche Anzahlen von Protonen besitzen, so dass dies ebenfalls zu einer Erhöhung der gefundenen Signale führt.

Tabelle 23 - Auflistung der Signale im MS nach der Umsetzung mit POCl_3

MS des GDNT / GDNT-P Gemische nach der Reaktion mit POCl_3	
gefundener m/z Wert	Vermutliche Struktur
1444,29	
1460,27	GDNT
1478,00	GDNT(-OH-Gruppe $+\text{Cl}^-$ -Ion) oder $+\text{H}_2\text{O}$ oder $+\text{NH}_4^+$
1486,34	
1502,32	
1524,28	
1540,25	GDNT + 1 PO_4^{3-}
1562,25	GDNT + 1 PO_4^{3-} + Na
1582,29	GDNT + 1 PO_4^{3-} + Na + $\text{NH}_4^+/\text{H}_2\text{O}$
1604,23	
1620,21	GDNT + 2 PO_4^{3-}
1645,00	GDNT + 2 PO_4^{3-} + Na
1662,24	
1685,00	
1698,72	GDNT + 3 PO_4^{3-}
1710,52	
1726,52	
1848,54	GDNT + 5 PO_4^{3-}
1964,76	
1992,78	
2008,72	Eine These, aber chemisch nicht möglich, da nur 6 OH-Gruppen am Molekül GDNT + 7 PO_4^{3-}

Abbildung 4.84 zeigt die ablaufende Reaktion des Lipides mit dem POCl_3 . Abbildung 4.85 zeigt das gesamte MS.

4.7 Charakterisierung der phosphorylierten Tetraetherlipid-Fraktion

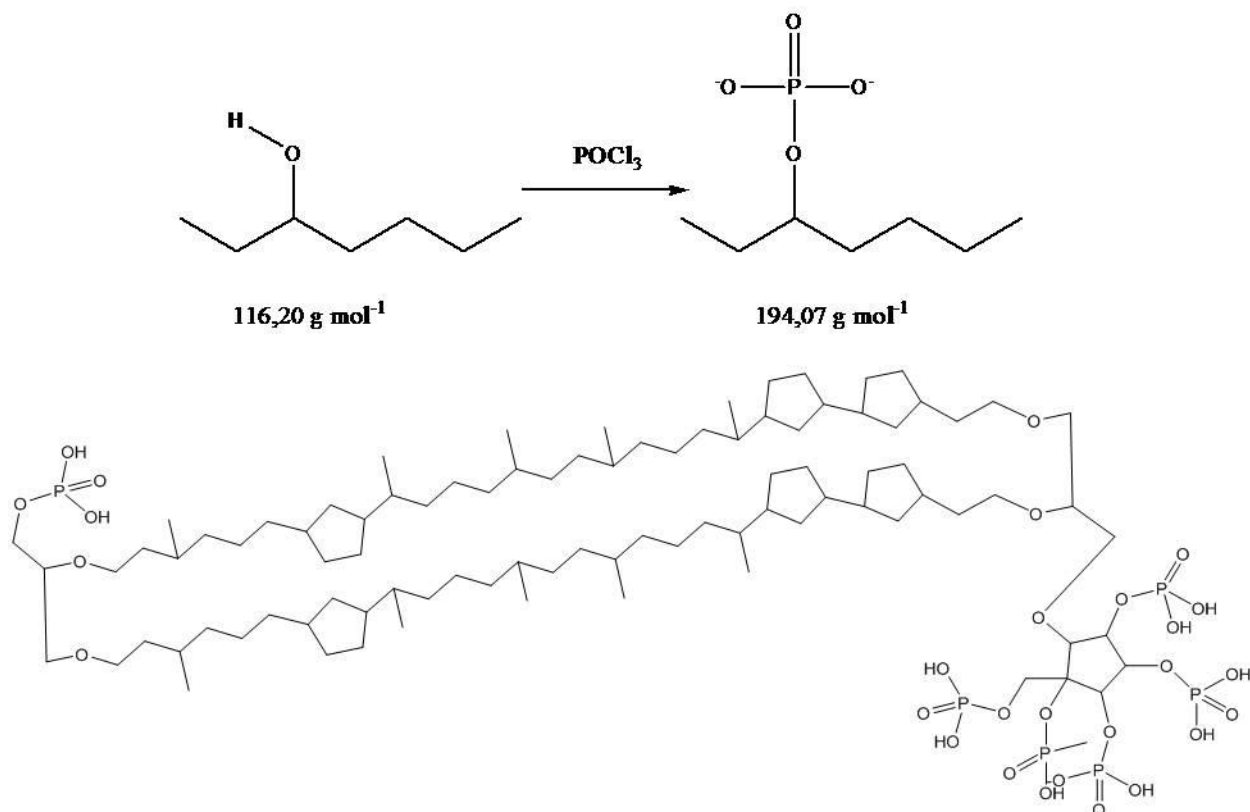


Abbildung 4.84 - Schema zur Reaktion des GDNT mit POCl_3 zu GDNT-P und die daraus folgende Struktur des Lipides bei maximaler Phosphorylierung

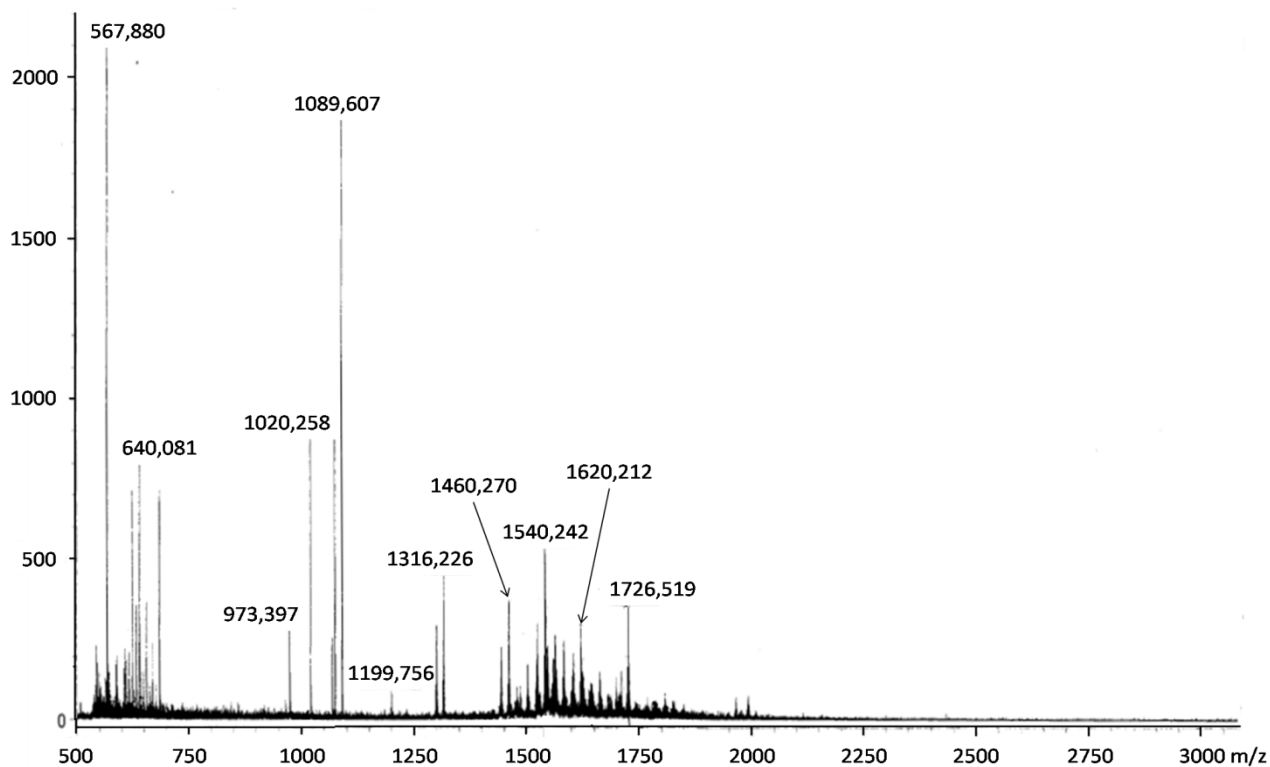


Abbildung 4.85 - Gesamtes Massenspektrum des GDNT-P

4.7.2 NMR-Untersuchung

Nach Durchsicht der Massenspektren und Berücksichtigung der Tatsache, dass das GDNT mindestens drei Isomere bildet, kann keine Aussage zur Struktur des/der Lipide/s getroffen werden. Genau wie beim GDNT auch ist eine genaue Zuordnung aller Atome in den folgenden NMR-Spektren nicht möglich. Die verschiedenen Fraktionen müssten vor einer Charakterisierung gereinigt und aufgetrennt vorliegen.

Bei der Charakterisierung des GDNT stellten sich drei Strukturen heraus: Das Lipid mit drei, vier und fünf 5er Ringen. Bei den Strukturen steht nicht fest, wo sich die 5er Ringe befinden. Also liegen drei Strukturen mit, optimistisch geschätzt, je zwei Isomeren – also schon sechs Strukturen vor. Diese sind jetzt laut MS-Spektrum 1x, 2x 3x, 5x und 7x phosphoryliert, dies führt zu mindestens 30 Strukturen plus Verunreinigungen. Unter diesen Voraussetzungen ist keine Charakterisierung über NMR möglich, auch wenn davon ausgegangen wird, dass die unpolare Seitenkette nicht von der Phosphorylierung betroffen ist. Dennoch werden die Strukturen, wie beim GDNT auch, mit unterschiedlichen 5er-Ringanzahlen zu verschiedenen Signalen im Spektrum führen. Die folgenden Spektren vergleichen die Veränderung der chemischen Verschiebungen zwischen GDNT und GDNT-P. Hierzu zeigen die folgenden Diagramme immer oben den GDNT und unten den GDNT-P. Alle NMR-Spektren wurden in CDCl_3 durchgeführt.

4.7.2.1 ^1H -Kernresonanz-Spektren

Die Auswertung beginnt mit der Analyse des 700 MHz-Protonenspektrums. Hier zeigt sich in Abbildung 4.86 im Vergleich zum GDNT Spektrum (oben), dass der GDNT-P (unten) im Bereich von 0,82 bis 0,92 ppm eine nahezu identische Verteilung der Peaks aufweist. Das Signal des GDNT-P ist insgesamt minimal weniger tieffeldverschoben als beim GDNT. Zwischen 0,82 und 0,92 ppm liegt das sehr intensive Signal der CH_3 -Gruppen. Der GDNT zeigt deutlich zwei Triplet-Signale (durch überlagernde Dubletts), welche beim GDNT-P nicht mehr so deutlich ausgebildet, aber immer noch zu erkennen sind.

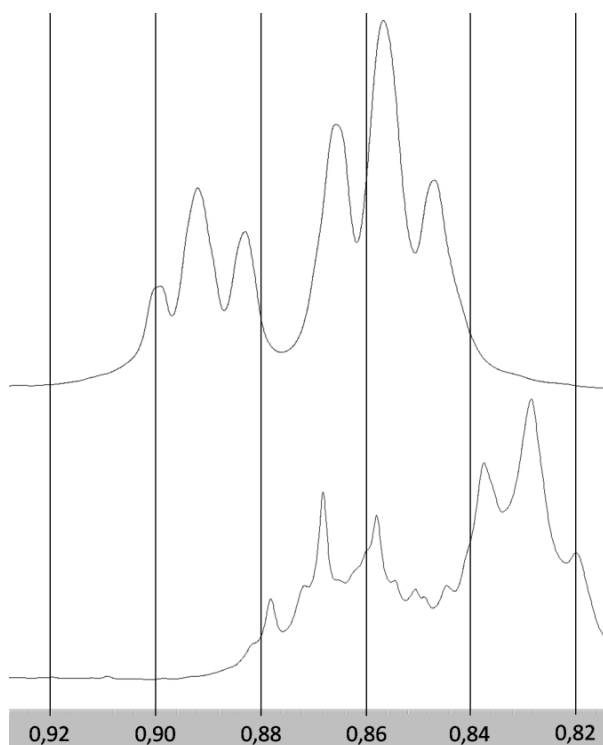


Abbildung 4.86 - 700 MHz-NMR- ^1H -Spektrum GDNT gegen GDNT-P im Bereich von 0,82 - 0,92 ppm aufgetragen

Die folgende Signalkette zwischen 1,0 und 1,8 ppm wird in Abbildung 4.87 dargestellt. Zwischen ca. 1,0 und 1,2 ppm liegt ein Signal, welches zwei Spitzen besitzt. Diese sind beim GDNT-P weniger stark ausgeprägt, als beim GDNT. Der größte Unterschied zwischen den Spektren zeigt sich in den drei Signalen zwischen 1,2 und 1,45 ppm.

Bei dem GDNT-P ist das erste Signal bei 1,25 ppm sehr viel intensiver und daher breiter ausgeprägt als beim GDNT. Das beim GDNT sichtbare zweite Signal bei ~1,3 ppm wird beim GDNT-P vollständig verdeckt. Die dritte Signalspitze ist jedoch gut zu erkennen. Im Bereich zwischen 1,5 und 1,8 ppm folgen die nächsten Signale.

Diese sind im GDNT-P-Spektrum (unten) aufgrund der starken Intensität des Signales bei 1,25 ppm, im Verhältnis betrachtet, nicht mehr so intensiv. Es lassen sich aber die drei breiten schwachen Peaks erkennen. Auch die im GDNT-Spektrum (oben) gut, wenn auch nur angedeutet sichtbaren Multiplizitäten der Signale lassen sich auch beim GDNT-P-Spektrum erahnen. Die folgenden zwei intensiveren Signale sind bei GDNT und GDNT-P gleich gut zu erkennen. In beiden Spektren ist der zweite Peak etwas intensiver als der erste.

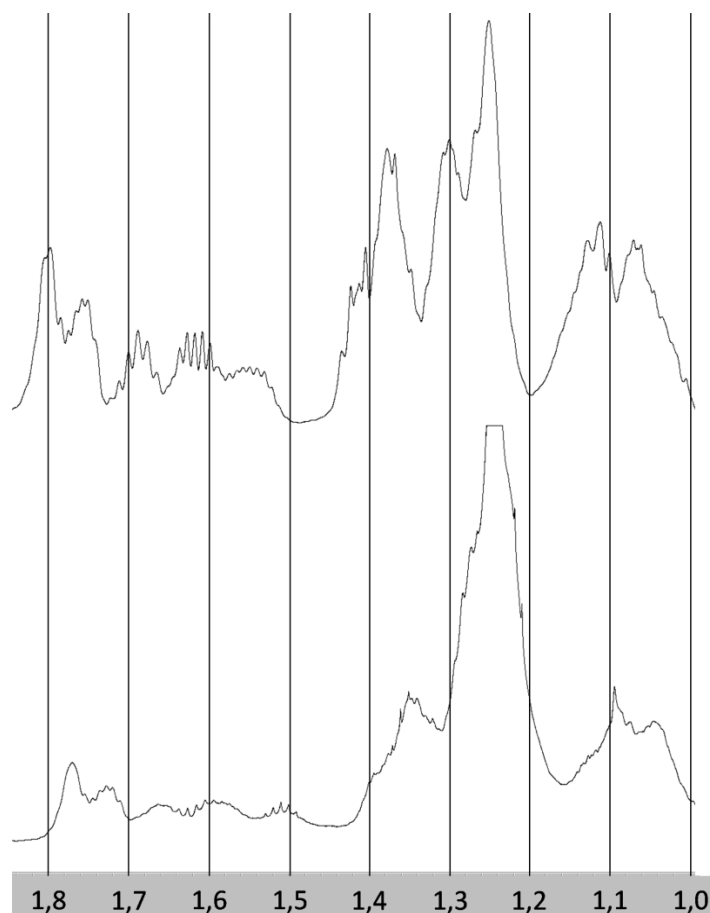


Abbildung 4.87 - 700 MHz-NMR- ^1H -Spektrum GDNT gegen GDNT-P im Bereich von 1,0 - 1,85 ppm aufgetragen

Nach diesem komplexen Signal folgt in Abbildung 4.88 ein Abschnitt des Spektrums mit wenigen Signalen. Diese unterscheiden sich bei GDNT und GDNT-P stark voneinander.

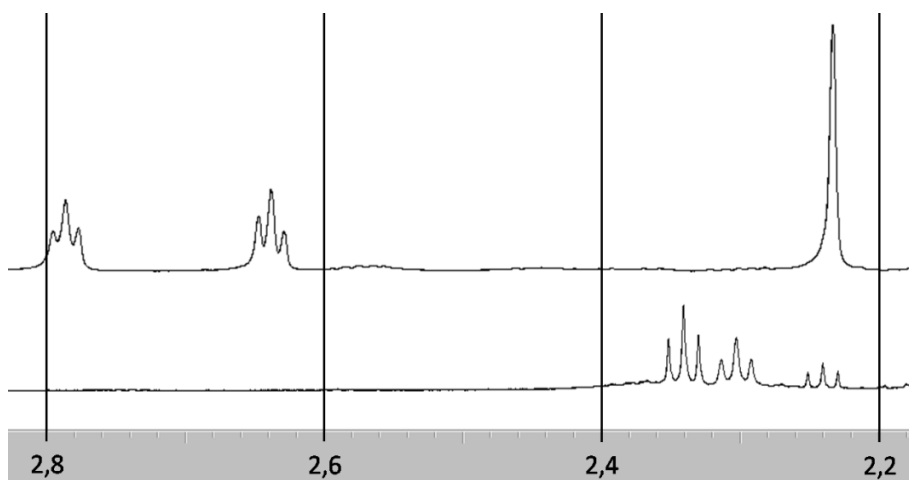


Abbildung 4.88 - 700 MHz-NMR- ^1H -Spektrum GDNT gegen GDNT-P im Bereich von 2,2 - 2,8 ppm aufgetragen

Die ppm-Werte sind nicht gleich und auch die Multiplizitäten unterscheiden sich. Um welche Protonen es sich handeln könnte, kann an dieser Stelle wiederum nicht genau eingeschätzt werden.

Denn für die angenommene Struktur des GDNT wurde über *BioChemDraw*^[98] (Abbildung 4.21) ein Signal bei 2,13 ppm für die einzelnen CH₂-Gruppe des 5er Ringes berechnet. Es sollte sich also über das DEPT-135- und 2D-Spektrum für die drei Triplette eine Koppelung oder Position zu einer CH₂-Gruppe herstellen lassen. Dies ist aber nicht der Fall. Die zwischen 3,3 und 4,4 ppm liegende Signalreihe zeigt zwischen GDNT und GDNT-P recht starke Unterschiede. Anders als bei den bisherigen Signalen ist dies auch zu erwarten. Bei den vorherigen Signalen handelt es sich um die CH/CH₂/CH₃-Gruppen Protonen von dem Teil des Lipides, das zwischen GDNT und GDNT-P identisch ist. Daher sollten die chemischen Verschiebungen nur minimal sein. Die Phosphorylierungen sollten an den OH-Gruppen ablaufen. Somit werden auch nur die Protonen in direkter Umgebung der OH-Gruppen stark beeinflusst. Alle Protonen, die in der Nähe der OH-Gruppen sitzen, liegen im Spektrum bei über 3 ppm.

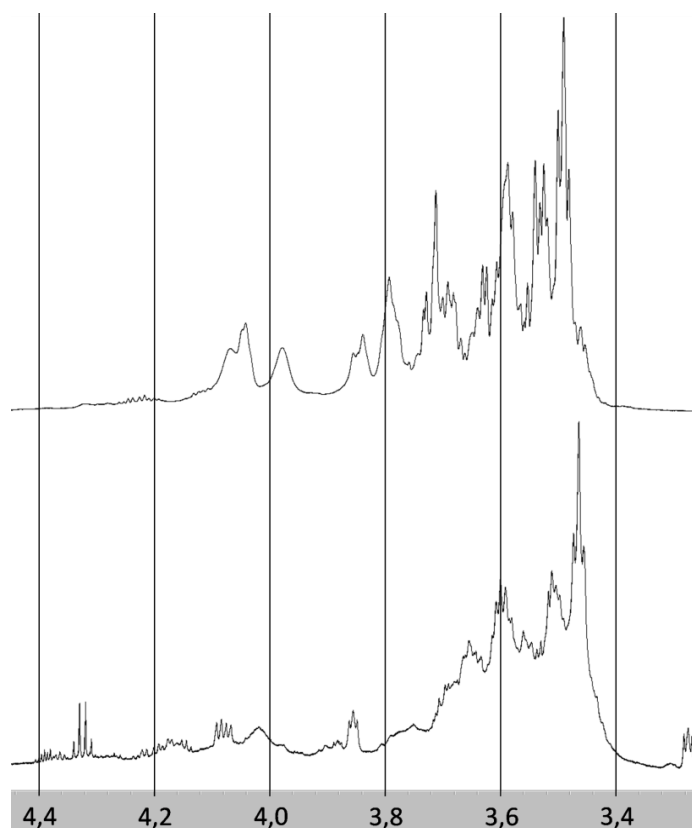


Abbildung 4.89 - 700 MHz-NMR-¹H-Spektrum GDNT gegen GDNT-P im Bereich von 3,4 - 4,4 ppm aufgetragen

Abbildung 4.89 zeigt, dass die Multiplizitäten der Peaks des GDNT-P (unten) teilweise viel deutlicher ausgeprägt sind als beim GDNT (oben). Auch sind die Protonen-Signale über einen breiten Bereich verteilt. Beim GDNT liegen die Protonen-Signale zwischen 3,4 und 4,3 ppm. Das GDNT-P zeigt die Protonen-Signale von 3,3 bis 4,5 ppm. Dies ist der zweite direkte Hinweis auf eine Veränderung der Struktur. Die ppm-Werte der Protonen, die vorher an einer OH-Gruppe lagen und jetzt an einer PO_4^{3-} -Gruppe liegen, werden von *BioChemDraw*^[98] mit Werten von bis zu 4,3 ppm berechnet. Im Vergleich hierzu lagen die berechneten ppm-Werte der Protonen maximal bei 3,8 ppm. Der Einfluss der Tieffeldverschiebung erstreckt sich über zwei Bindungen.

4.7.2.2 ^{31}P -Kernresonanz-Spektren

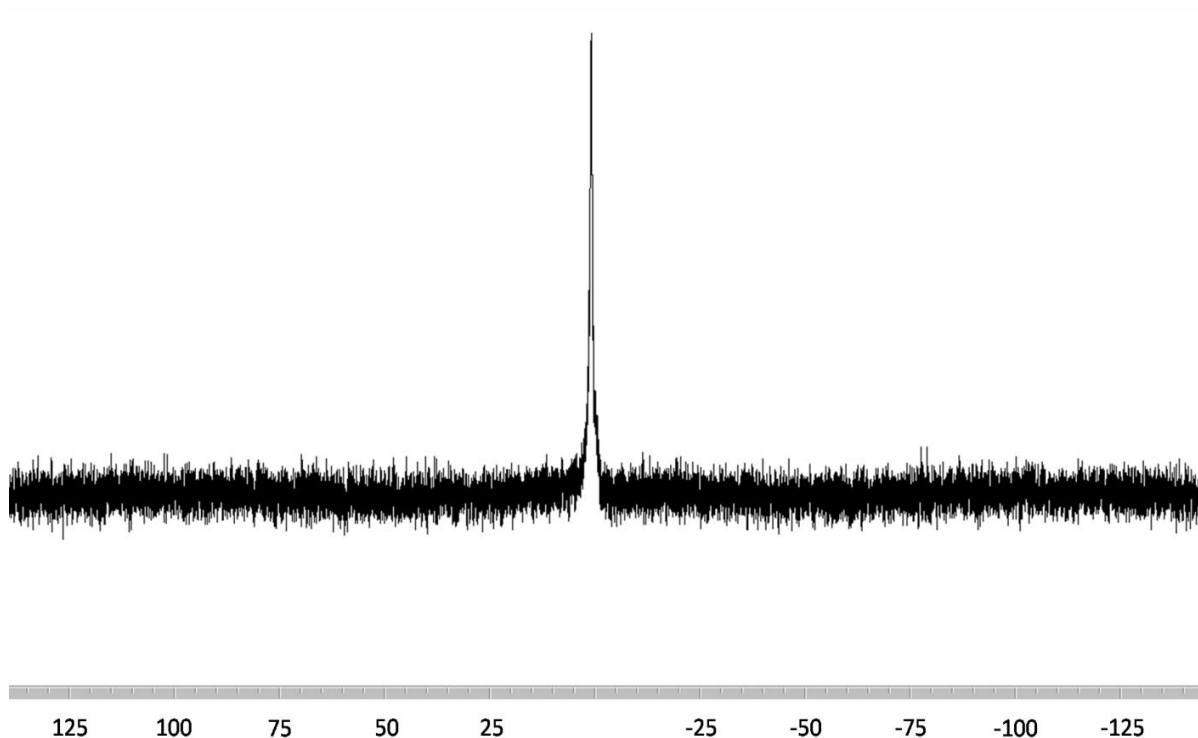


Abbildung 4.90 - 400 MHz-NMR- ^{31}P -Spektrum

An dieser Stelle soll kurz das ^{31}P -Spektrum ausgewertet werden. Es zeigt ein einzelnes breites Signal (Abbildung 4.90), welches von -1,3 bis +3 ppm reicht. Das Maximum liegt bei 0,92 ppm. Damit liegt es knapp oberhalb des typischen Bereiches für Phosphate^[91]. Sie zeigen üblicherweise chemische Verschiebungen, die zwischen -20 und 0 ppm liegen. Dies ist ein weiterer Beweis für die erfolgte Phosphorylierung des Lipides. Es lässt sich allerdings keine Information über die Anzahl der Phosphatgruppen gewinnen.

4.7.2.3 ^{13}C -Kernresonanz-Spektren

Laut den Berechnungen von *BioChemDraw*^[98], bestehen die Veränderungen im Kohlenstoff-Spektrum darin, dass die Kohlenstoffe in α -Position und β -Position zu einer Phosphatgruppe ca. 3,5 ppm hochfeldverschoben sind. Bei der Anwesenheit mehrerer Phosphatgruppen im Bereich der Positionen addiert sich der Effekt. Damit werden primär die Positionen Kohlenstoffe außerhalb der Seitenkette verändert. Die folgende Abbildung 4.91 zeigt eine Struktur des phosphorylierten Lipides. Hier wird davon ausgegangen, dass alle OH-Gruppen GDNT-P phosphoryliert wurden. Die mit Buchstaben markierten Kohlenstoffe können beim GDNT genau zugeordnet werden und werden denen des GDNT-P gegenübergestellt (Tabelle 24).

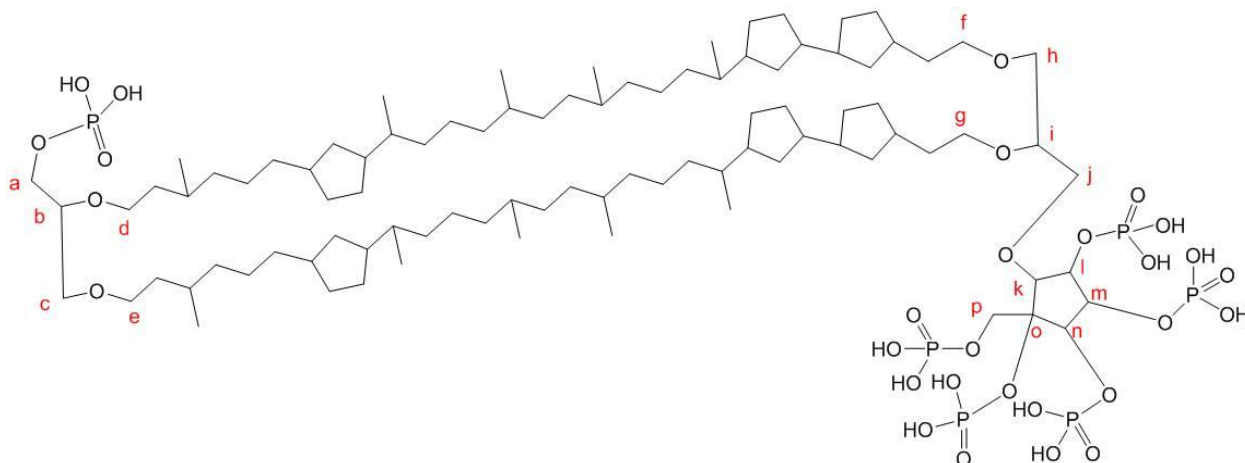


Abbildung 4.91 - Angenommene Struktur des GDNT-P nach vollständiger Phosphorylierung zum Vergleich der ppm-Veränderung im ^{13}C -Spektrum

Tabelle 24 stellt die chemische Verschiebung von GDNT und GDNT-P gegenüber. Insgesamt sind die chemischen Verschiebungen für die Kohlenstoffe in α - und β -Position zur Phosphatgruppe um ca. 3-8 ppm niedriger. Nur Kohlenstoff (a) bildet die Ausnahme. Er ist der einzige Kohlenstoff, der nur eine Phosphatgruppe in der Nachbarschaft hat. Im Zuckerring haben alle Kohlenstoffe zwei bis drei PO_4^{3-} -Gruppen in direkter Umgebung (α - und β -Position).

Tabelle 24 - Veränderung der ppm-Werte im ^{13}C -Spektrum von GDNT-P gegenüber GDNT

^{13}C -Veränderung berechnet über <i>BioChemDraw Ultra</i>			
Kohlenstoff	GDNT	GDNT-P	
	ppm	ppm	Δppm
a	61,6	67,1	5,5
b	82,7	80,1	-2,6
c	71,6	71,4	-0,2
d	65,5	65,2	-0,3
e	68	68	0
f	68,3	68,3	0
g	65,8	65,8	0
h	71,9	71,9	0
i	80,8	80,8	0
j	68,9	68,3	-0,6
k	79,6	74,3	-5,3
l	68,7	63,2	-5,5
m	71,2	63,3	-7,9
n	71,2	67,5	-3,7
o	78,4	75,1	-3,3
p	64,2	60,7	-3,5

4.7.2.4 2D- ^1H - ^{13}C -Spektrum

In der folgenden Tabelle 25 werden die chemischen Verschiebungen der Kohlen- und Wasserstoffe aus dem 2D Spektrum aufgelistet. Über das DEPT-135 Spektrum konnten die Gruppen der Kohlenstoffe in $\text{CH} / \text{CH}_2 / \text{CH}_3 / \text{C}_q$ eingeteilt werden. Wie oben beschrieben, konnte aber aufgrund der vielen verschiedenen Strukturen bzw. Isomeren, sowie dem unterschiedlichen Grad der Phosphorylierung keine exakte Zuordnung aller Kohlen- und Wasserstoffe erreicht werden. Dies gilt hier besonders für die Kohlenstoffe außerhalb der Etherbrücken, siehe Abbildung 4.91 (a bis p). Tabelle 25 und die Abbildungen 4.92 und 4.93 zeigen das aufgeteilte 2D- ^1H - ^{13}C -Spektrum.

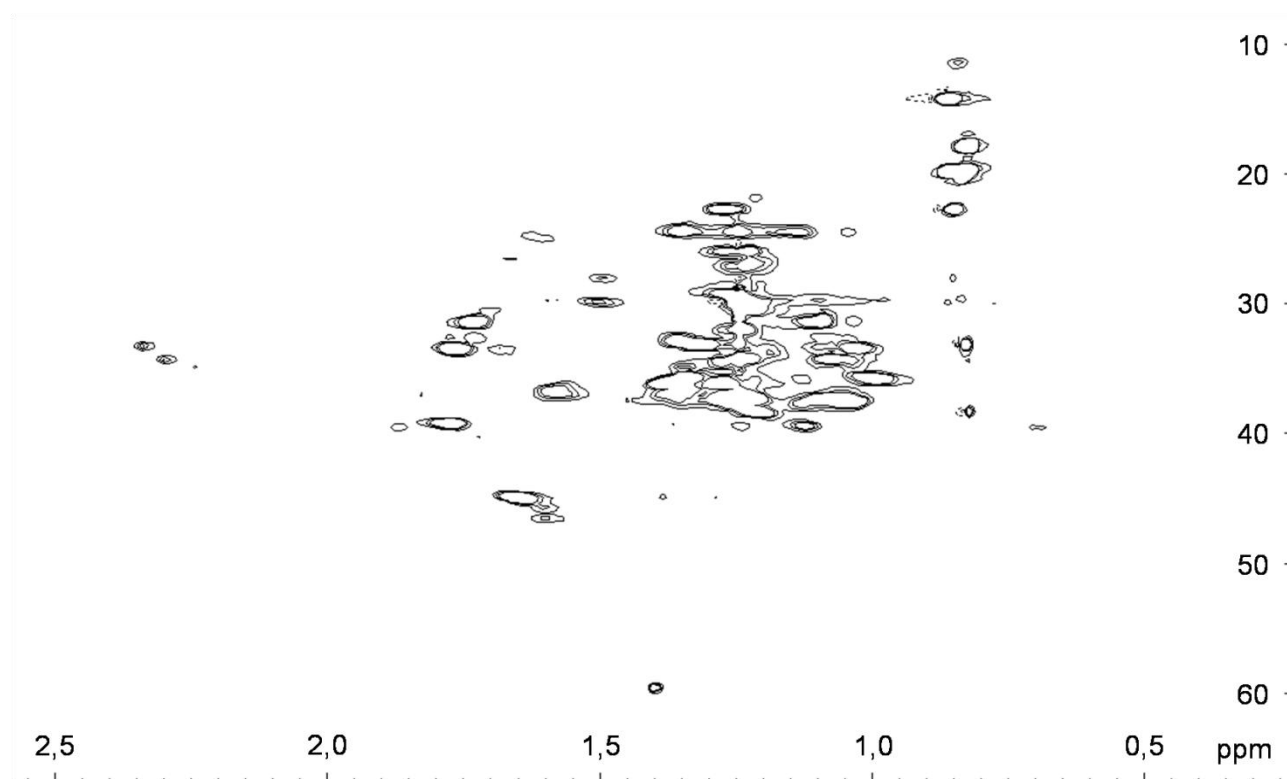


Abbildung 4.92 - 700 MHz-2D- ^1H - ^{13}C -Spektrum des GDNT-P ^1H -Bereich 0,5-2,5 ppm, ^{13}C -Bereich 10-60 ppm

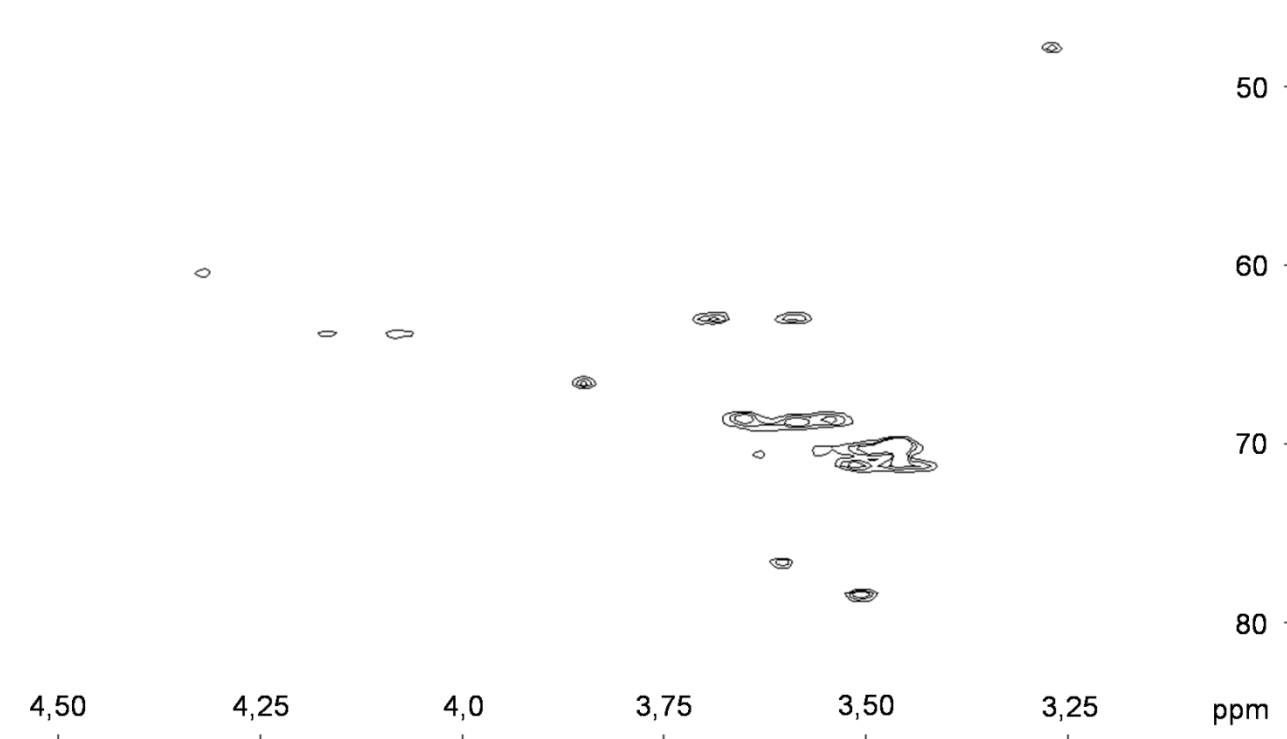


Abbildung 4.93 - 700 MHz-2D- ^1H - ^{13}C -Spektrum des GDNT-P ^1H -Bereich 3,25-4,5 ppm, ^{13}C -Bereich 50-80 ppm

Tabelle 25 - Auflistung aller Signale des 700 MHz-2D- ^1H - ^{13}C -Spektrum des GDNT-P mit den zugeordneten Gruppen ermittelt aus dem DEPT-135-Spektrum

Auflistung der chemischen Verschiebungen aller im 2D- ^1H - ^{13}C -Spektrum gefundenen Signale								
^1H -ppm Wert	^{13}C -ppm Wert	Gruppe	^1H -ppm Wert	^{13}C -ppm Wert	Gruppe	^1H -ppm Wert	^{13}C -ppm Wert	Gruppe
0,81	17,49	CH ₃	1,26	26,93	CH ₂	2,24	34,98	CH ₂
0,83	38,12	CH	1,27	29,07	CH ₂	2,29	34,35	CH
0,83	29,57	CH ₂	1,27	35,99	CH ₂	2,34	33,09	CH
0,84	19,75	CH ₃	1,27	22,40	CH ₂	3,28	47,81	a bis p
0,85	27,93	CH ₂	1,28	25,67	CH ₂	3,44	71,08	a bis p
0,85	22,40	CH ₃	1,32	32,97	CH	3,46	70,06	a bis p
0,86	13,97	CH ₃	1,34	24,16	CH ₂	3,50	71,13	a bis p
0,99	35,61	CH ₂	1,34	34,73	CH ₂	3,51	78,17	a bis p
1,03	33,22	CH ₂	1,35	35,86	CH ₂	3,51	71,08	a bis p
1,05	37,24	CH ₂	1,35	36,74	CH ₂	3,55	71,01	a bis p
1,06	34,22	CH	1,38	44,67	CH	3,55	68,52	a bis p
1,10	31,08	CH ₂	1,40	59,51	a bis p	3,56	70,24	a bis p
1,11	37,24	CH ₂	1,49	27,81	CH	3,59	68,67	a bis p
1,12	39,26	CH	1,58	36,49	CH ₂	3,59	62,89	a bis p
1,14	24,16	CH ₂	1,59	24,91	CH ₂	3,60	76,60	a bis p
1,21	21,77	CH	1,60	46,30	CH	3,63	70,46	a bis p
1,21	37,50	CH ₂	1,63	24,66	CH ₂	3,65	68,56	a bis p
1,22	26,93	CH ₂	1,65	44,67	CH	3,69	62,93	a bis p
1,22	25,79	CH ₂	1,67	26,30	CH ₂	3,85	66,48	a bis p
1,23	29,69	CH ₂	1,67	33,34	CH ₂	4,08	63,70	a bis p
1,24	31,46	CH ₂	1,73	31,20	CH ₂	4,18	63,78	a bis p
1,24	32,71	CH ₂	1,76	33,09	CH	4,32	60,52	a bis p
1,24	39,26	CH	1,77	39,01	CH			
1,24	24,16	CH ₂	1,87	39,38	CH ₂			

4.7.3 IR-Spektroskopie des GDNT-P

Abbildung 4.94 zeigt IR-Spektren der beiden Lipide. Die Spektren zeigen identische Signale in den meisten Bereichen, was zu erwarten war. Der größte Unterschied liegt bei den Banden, die nur im GDNT-P-Spektrum vorhanden sind: 1250, 1090 und 1013 cm^{-1} . Diese Bereiche lassen sich den Phosphatgruppen zuordnen.

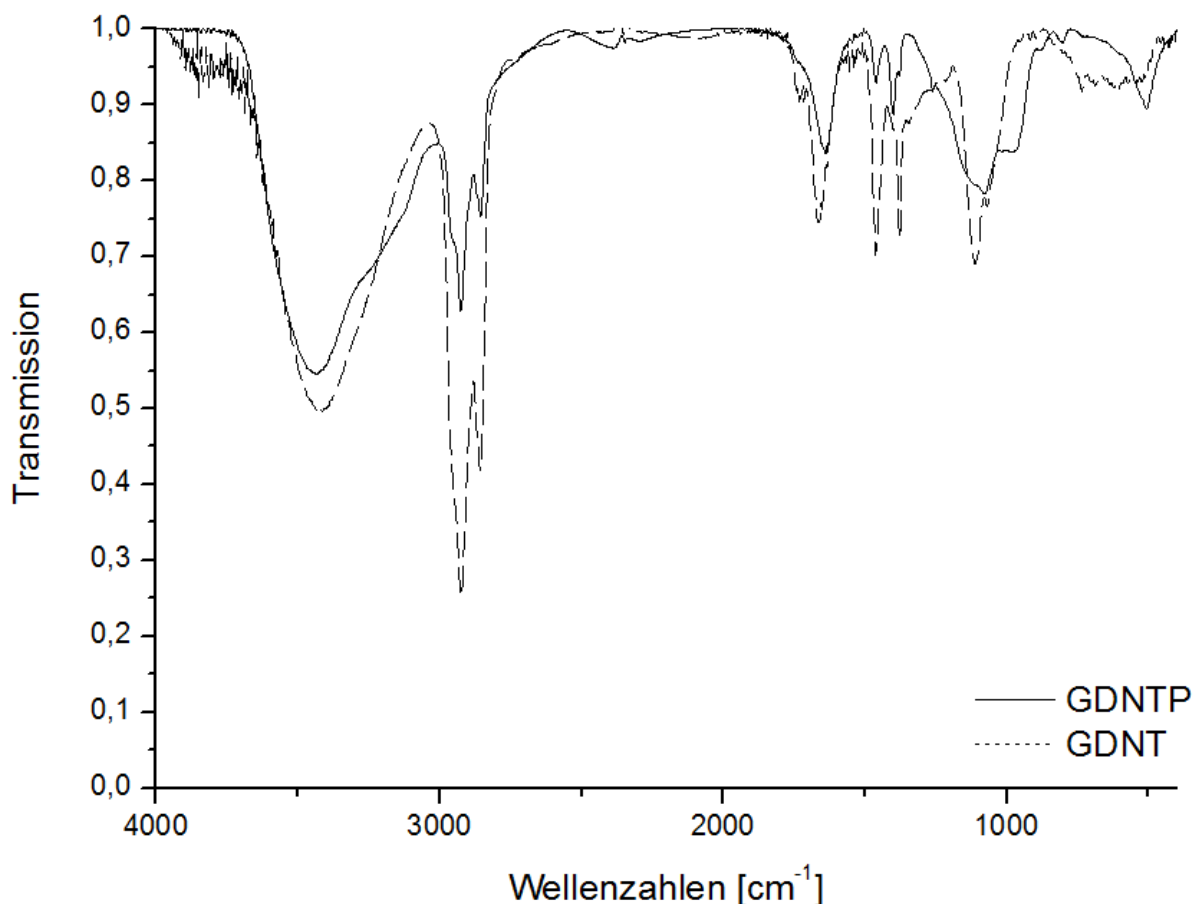


Abbildung 4.94 - IR-Spektren eines KBr-Presslings des GDNT-P und GDNT

4.8 Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel in verschiedenen Medien über ein phosphoryliertes Tetraetherlipid

In Tabelle 26 werden die Banden der beiden Spektren von GDNT und GDNT-P verglichen. Beide IR-Spektren wurden mit KBr-Presslingen durchgeführt

Tabelle 26 - Auflistung der Banden der IR-Spektren von GDNT-P und GDNT

Auswertung der IR-Spektren von GDNT-P und GDNT				
cm ⁻¹	GDNT	GDNT-P	Gruppe	Schwingungstyp
3447	ja	ja	O-H	Valenzschwingung
2928	ja	ja	CH ₂	Valenzschwingung
2860	ja	ja	CH/CH ₃	Valenzschwingung
1668	ja	ja	H ₂ O	
1462	ja	ja	CH/CH ₃	Deformationsschwingung
1379	ja	ja	CH ₃ /C-O/O-H	sym. Deformationsschwingung
1250	nein	ja	P=O	
1117	ja	ja	C-O	Valenzschwingung
1090	nein	ja	C-O/P-O-Alkyl	Valenzschwingung
1013	nein	ja	C-O/P-O-Alkyl	Valenzschwingung
739	ja	nein	CH ₂	<i>rocking</i> Schwingung

4.8 Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel in verschiedenen Medien über ein phosphoryliertes Tetraetherlipid

In diesem Kapitel werden die letzten Experimente der Dissertation beschrieben. Sie beschäftigen sich mit der Darstellung von Calciumphosphat-Nanopartikeln, welche mit der neuen phosphorylierten GDNT-Fraktion stabilisiert wurden. Wie in der Charakterisierung beschrieben, liegt hier ein relativ unspezifisches Gemisch diverser Lipide vor. Das GDNT-P ist weder in Ethanol, 2-Propanol, Wasser, Chloroform noch in einem Gemisch aus 3 Volumen-Teilen Isopropanol und 7 Volumen-Teilen Wasser vollständig löslich, trotz der Verwendung eines Ultraschallbades. Trotzdem wurden Versuchsreihen mit ähnlichen Konzentrationen und Lösungsmengen wie bei den GDNT-Versuchen durchgeführt.

4.8.1 GDNT-P Reihe in Wasser und einem Wasser-Isopropanol-Gemisch

Bei den Versuchen zur Stabilisierung des Calciumphosphates wurden zum einen eine Reihe mit 40 mL Wasser und zum anderen 40 mL eines Wasser-Isopropanolgemisches im Volumenverhältnis 7 (Teile Wasser) : 3 (Teile Isopropanol) und das in Isopropanol aufgeschlammte Lipid (0,25 mL) vorgelegt. Von den auf pH 8 eingestellten Calcium- und Phosphatlösungen wurden je 0,25 / 0,5 / 0,75 / 1,0 / 1,25 / 1,5 mL zugepumpt. Hier kam es bei beiden Dispersionsmitteln allerdings schon innerhalb 30 min Rührzeit nach der Zugabe bei nahezu allen Proben zur Ausbildung von sedimentierenden Agglomeraten, daher wurden diese Proben nicht ausführlicher untersucht.

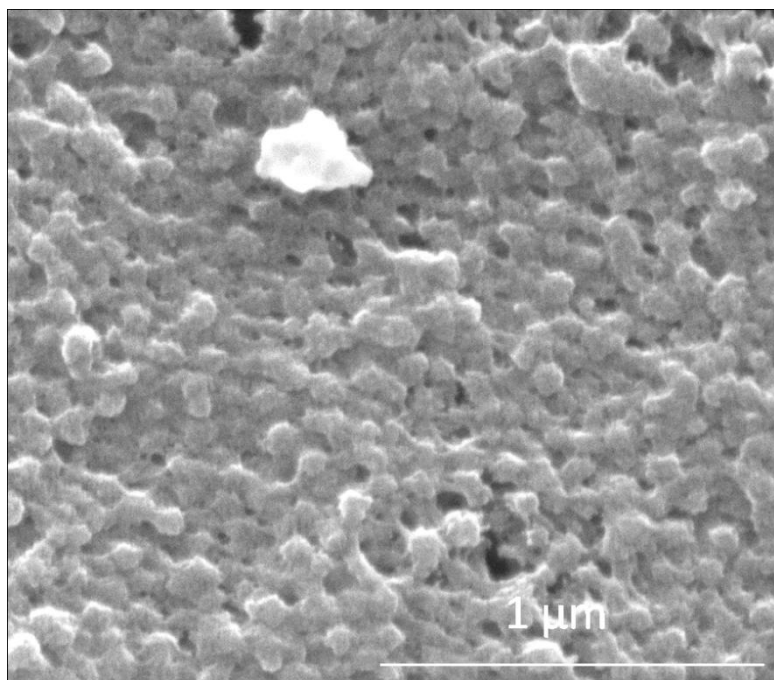


Abbildung 4.95 - REM-Aufnahme der GDNT-P Probe 40-0,25-1,0 in Ethanol

Nur die Probe mit vorgelegtem Wasser und zugegebenem Volumen an Calcium- und Phosphatlösungen von 0,5 mL zeigte Nanopartikel. Abbildung 4.95 zeigt diese stark verwachsenen 40 bis 130 nm großen Partikel.

4.8.2 GDNT-P Reihe in Ethanol

Bei den Versuchen zur Stabilisierung des Calciumphosphates wurden 40 mL Ethanol mit 0,25 mL GDNT-P Lösung, wegen der unvollständigen Löslichkeit nur ca. 1 g L^{-1} , vorgelegt. Nun wurden je 0,25 / 0,5 / 0,75 / 1,0 / 1,25 / 1,5 mL Calcium- und Phosphatlösung (pH 8) zugepumpt und 30 min gerührt. Die 0,25 mL Probe sedimentierte während der Zugabe der Calcium- und Phosphatlösung.

4.8 Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel in verschiedenen Medien über ein phosphoryliertes Tetraetherlipid

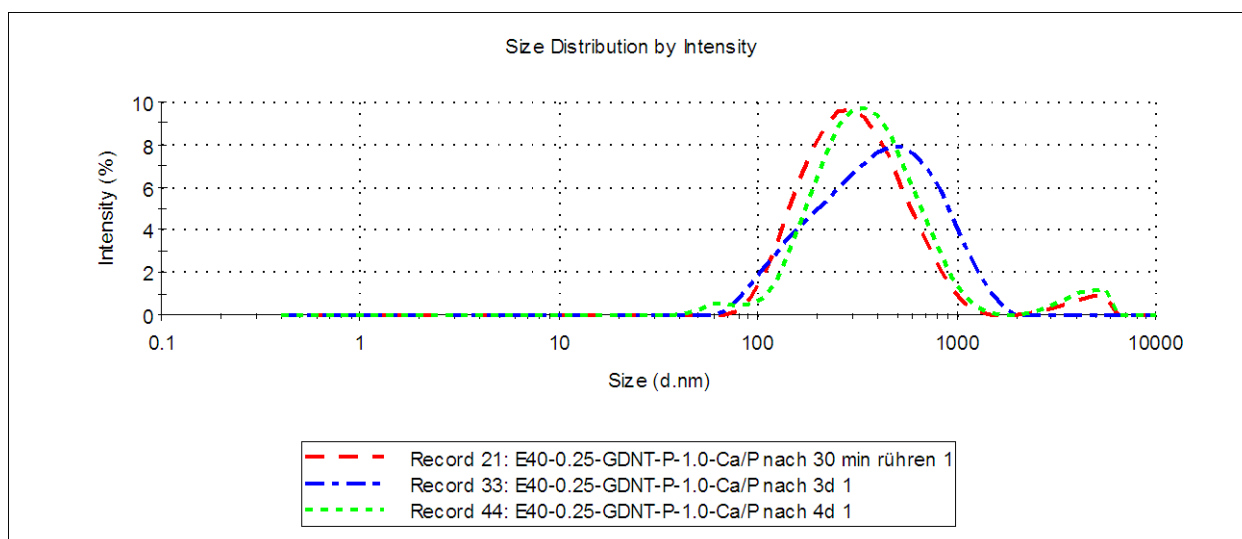


Abbildung 4.96 - DLS Messung der GDNT-P-CaP-Nanopartikel in Ethanol synthetisiert

Die Zugabe von 0,5 mL schien ebenfalls noch nicht ausreichend für eine Stabilisierung zu sein, denn erst ab 0,75 mL bildeten sich laut DLS Nanopartikel mit einem Maximum des hydrodynamischen Radius von 275 bis 295 nm. Innerhalb der nächsten vier Tage stieg dieser Wert für die vier Proben auf 290 bis 315 nm an.

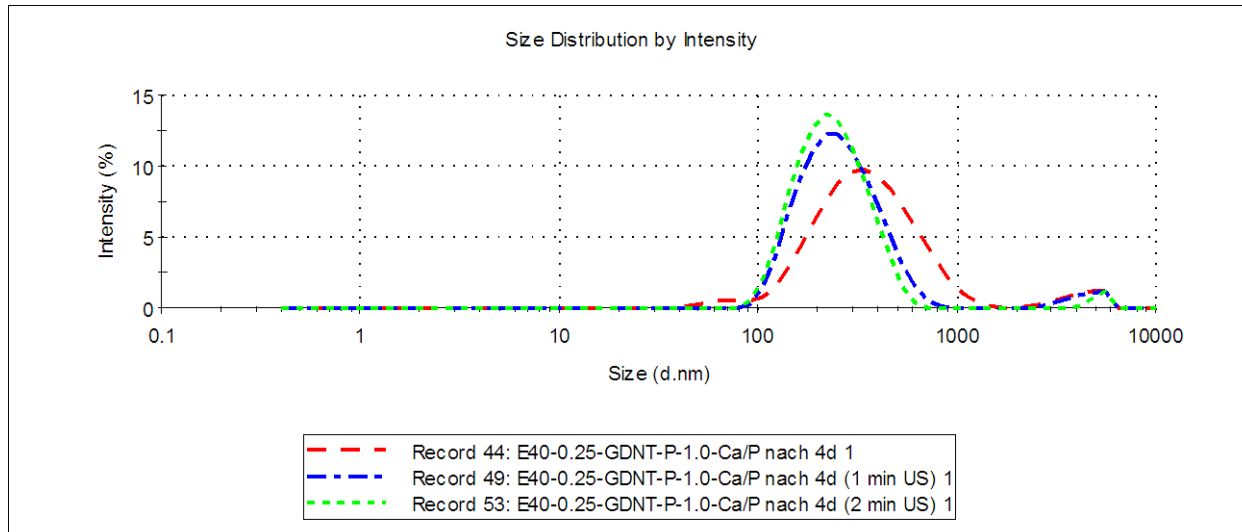


Abbildung 4.97 - DLS Messung der GDNT-P-CaP-Nanopartikel in Ethanol synthetisiert nach der Ultraschallbehandlung für 1 min und 2 min

Eine Ultraschallbad-Behandlung von einer Minute verringerte das Maximum der Durchmesser in der DLS auf 240 bis 260 nm (Abbildung 4.97). Eine weitere Minute reduzierte die Größe weiter (220 bis 235 nm), ohne dass sich der zwischen 0,2 und 0,3 liegende PDI veränderte.

Im REM zeigten alle angesetzten Proben zahlreiche verwachsene Nanopartikel mit sphärischer Morphologie. Die Hauptmenge der Nanopartikel zeigte eine Größe zwischen 25 und 100 nm.

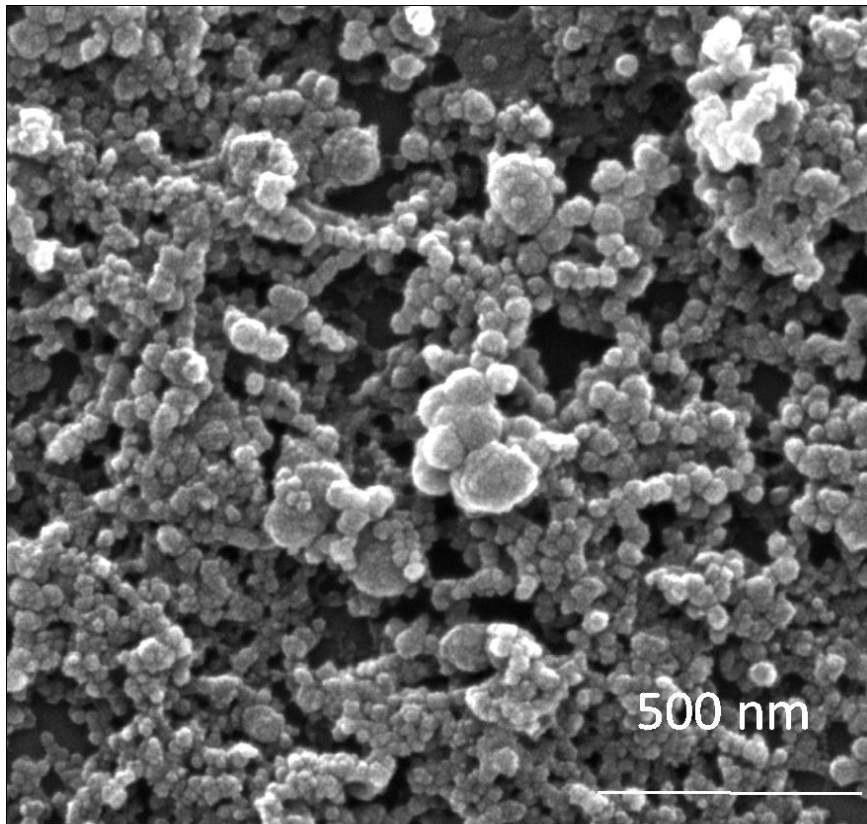


Abbildung 4.98 - REM-Aufnahme der GDNT-P Probe 40-0,25-1,0 in Ethanol

Größere Partikel von bis zu 150 nm waren recht selten. Eine Ultraschallbehandlung änderte die Ergebnisse nicht. Nahezu alle Proben zeigten bei den REM-Proben keine Hydroxylapatit- oder NaCl-Kristalle sowie Lipidtropfen oder ähnliches. Abbildung 4.98 zeigt die Nanopartikel der Probe mit 0,25 mL Lipid und 1,0 mL Calcium- und Phosphatlösung. Dies soll hier stellvertretend für die anderen Reihen stehen und gleichzeitig auch die Nanopartikel mit der einheitlichsten Größenverteilung sowie dem niedrigsten Grad der Verwachsung zeigen. Die REM-Bilder der Proben drei Tage nach der Fällung zeigten noch immer diese Ergebnisse und lassen daher dieselben Aussagen zu.

4.8.3 GDNT-P Reihe in Isopropanol

Die Darstellung der GDNT-P Calciumphosphat Nanopartikel erfolgte analog zur Reihe in Isopropanol, nur das Lösungsmittel wurde ausgetauscht. Die Probenstabilität war deutlich niedriger als die der Partikel in Ethanol. Die Proben mit zugegebenem Calcium- und Phosphatlösungsvolumen von je 0,5 / 0,75 / 1,0 / 1,25 / 1,5 mL zeigten nach einem

4.8 Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel in verschiedenen Medien über ein phosphoryliertes Tetraetherlipid

Tag einen feinen Niederschlag. Nur die Probe mit 0,25 mL blieb stabil. Die Proben zeigten nach der Herstellung ein ζ -Potential von -7 bis -10 mV, was ein Beweis für die Phosphorgruppen am Lipid ist. Die DLS-Messungen in Isopropanol ergaben keine sinnvollen Ergebnisse, da Isopropanol bei minimalen Temperaturveränderungen in der Flüssigkeit Schlieren bildet, die zu sehr starken Messfehlern führten. Die DLS der Proben zeigte immer Partikelradien von über 500 nm an.

Im REM zeigten sich nach der Herstellung sehr monodisperse, meist ca. 40 nm kleine Partikel (Abbildung 4.99 links). Die Probe mit 0,25 mL zeigte nach 2 min Ultraschall sehr einheitliche, nicht durch die mechanische Belastung beschädigte und nicht verwachsene Partikel (Abbildung 4.99 rechts). Die Probe mit einem zugegebenen Volumen von 1,0 mL Calcium- und Phosphatlösung wurde als Standard-GDNT-P-Probe reproduziert und zur weiteren Charakterisierung genutzt. Sie ist die Probe mit der höchsten Calcium- und Phosphatkonzentration ohne Hydroxylapatit-Kristalle im REM. Daher kann von einer vollständigen Umsetzung des Calciumphosphats und dem zugegebenen Lipid in Nanopartikel ausgegangen werden.

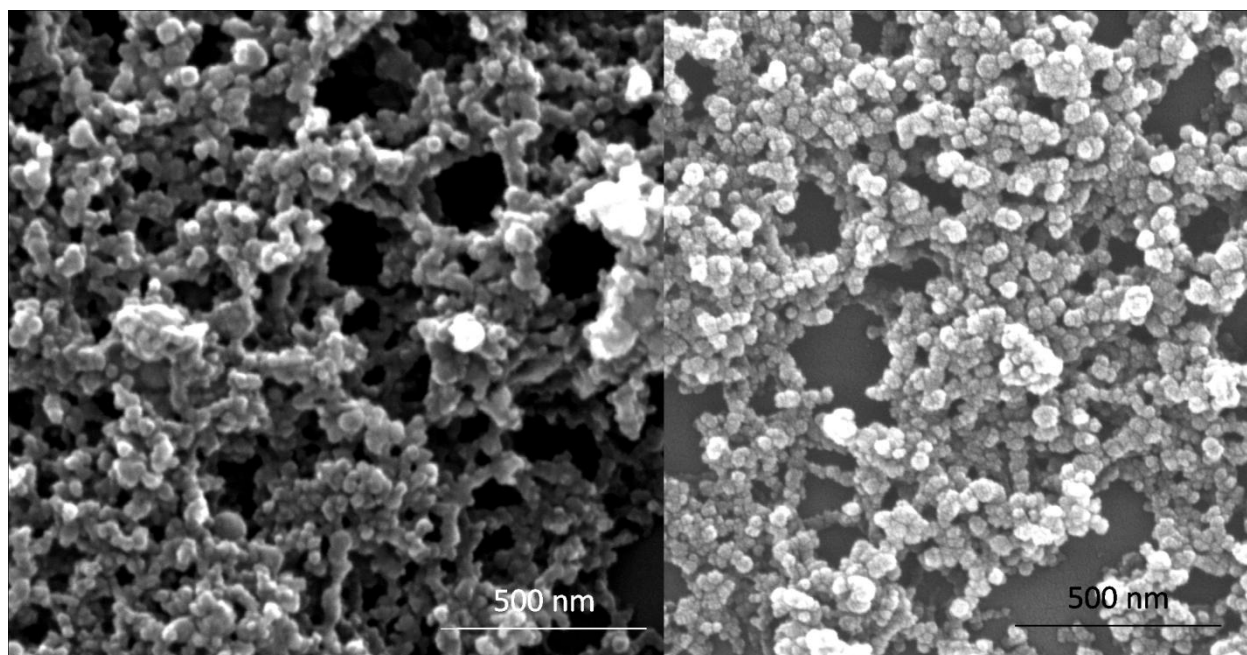


Abbildung 4.99 - REM-Aufnahmen einer Standard-GDNT-P-Probe vor und nach Ultraschallbehandlung

Eine Reinigung der Partikel war durch Ultrazentrifugieren möglich. Bei $30.000 \text{ U min}^{-1}$ für 35 min wurden alle Partikel abgetrennt und konnten im Ultraschallbad relativ gut redispergiert werden.

Die Partikel zeigten nach der Zentrifugation nur geringe Zerstörungsartfakte. In Abbildung 4.100 ist im unteren Bereich des REM-Bildes sichtbar, dass noch zahlreiche

4.8 Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel in verschiedenen Medien über ein phosphoryliertes Tetraetherlipid

Nanopartikel existieren, die bei einer vergrößerten Betrachtung nahezu nicht verwachsen sind. Im oberen Bereich hingegen sind mehrere μm -große Kristalle sichtbar. Sie sind das Produkt der durch den Ultraschall zerstörten Partikel, da die nicht mit Ultraschall behandelten Proben diese Kristalle nicht zeigten.

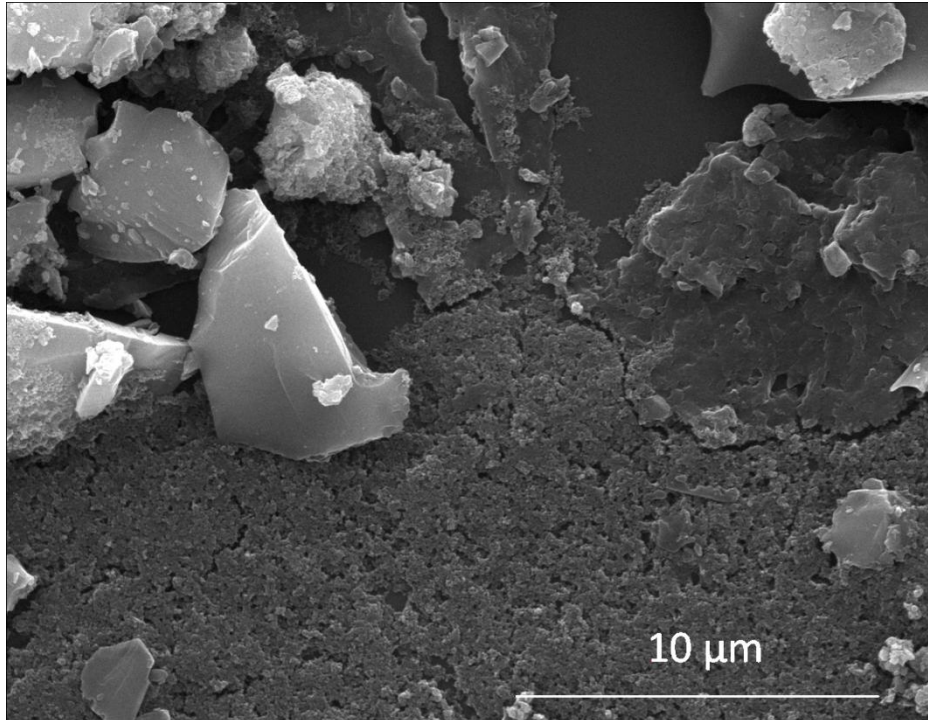


Abbildung 4.100 - REM-Aufnahme der GDNT-P-Nanopartikel nach dem Redispergieren durch 1 min Ultraschallbad-Behandlung

Das Redispergieren der Nanopartikel über einen Ultraschallfinger UP50H (50 W, 30 kHz) der Firma Hieschler Ultrasound Technology schlug fehl. Schon milde Bedingungen führten zur Zerstörung aller Partikel. Die Ultraschallbehandlung wurde mit der schwächsten Sonotrode für 10, 20, 30 und 40 s durchgeführt. Die Partikel wurden einer Amplitude von 70 % des maximal möglichen Ultraschalls (140 μm) und einer Zykluslänge von 80 % ausgesetzt. 100 % würde eine pausenlose Ultraschallbehandlung bedeuten. Die zugeführte Energie (*acoustic power density*) betrug über die kleine Sonotrode max. 125 W cm^{-2} . Dies war zu viel Energie für die Nanopartikel. REM und DLS bestätigten die Zerstörung.

Die Nanopartikel der Isopropanol-Reihe wurden zur Charakterisierung des Systems verwendet. Die genauen Bedingungen der Herstellung für diese Probe waren 40 mL Isopropanol, 0,25 mL GDNT-P und 1 mL Calcium- und Phosphatlösung (**Standard-GDNT-P-Probe**).

4.8.4 Charakterisierung der GDNT-P-Nanopartikel

Die Charakterisierung dieser Nanopartikel ist wesentlich leichter möglich als bei den GDNT-Partikeln, da sich aus einem 40 mL Ansatz ca. 2 mg Nanopartikel herstellen ließen. Somit konnten neben den beschriebenen Methoden auch noch EDX-, IR-, TG- und EA-Untersuchungen erfolgen.

4.8.4.1 Charakterisierung der GDNT-P-Nanopartikel über EDX

Bei den EDX-Untersuchungen wurden Nanopartikel vor und nach dem Ultrazentrifugieren (30.000 Umin^{-1} für 35 min) untersucht.

Tabelle 27 - EDX-Untersuchungen der GDNT-P-Nanopartikel Reinigung

EDX-Untersuchungen der GDNT-P-Nanopartikel		
	Mittelwert (%)	Mittelwert (%)
	nicht zentrifugiert	zentrifugiert
C	42,6	29,8
O	45,2	46,1
Ca	8,2	16
P	4	8,1
Ca/P (wt%)	2,1	2
Ca/P (molar)	2,67	2,56

Diese Partikel überstanden die Reinigung durch Ultrazentrifugation ohne große Schäden und konnten so auch gereinigt werden. Wie Tabelle 27 zeigt, nahm der prozentuale Anteil von Calcium und Phosphor zu und der des Kohlenstoffes ab. Der Anteil an anorganischen Anteilen wurde so verdoppelt (Sauerstoffgehalt blieb gleich). Wie schon beim GDNT beschrieben, ist EDX keine sehr genaue Methode, daher soll hier die Aussage, dass der Kohlenstoffanteil sinkt, genügen. Dies bedeutet, überschüssiger Lipid wird erfolgreich entfernt. Wie oben beschrieben, wurde die **Standard-GDNT-P-Probe** zur Charakterisierung der Nanopartikel verwendet. Hierzu erfolgten zahlreiche Wiederholungen der Herstellung der Probe. Sie waren reproduzierbar und zeigten untereinander sehr ähnliche Größenverteilungen und REM-Bilder.

4.8.4.2 Charakterisierung der GDNT-P-Nanopartikel über EA

Die Ergebnisse, gewonnen aus der Elementaranalyse, zeigen für Kohlenstoff, Sauerstoff, Phosphor und Calcium in der folgenden Tabelle 28 Werte, die von der EDX

4.8 Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel in verschiedenen Medien über ein phosphoryliertes Tetraetherlipid

Analyse teilweise stark abweichen. Der Hauptunterschied bei den EDX-Untersuchungen scheint der Kohlenstoff zu sein. Nach dem Zentrifugieren betrug sein Anteil (nach dem EDX) 30 %, die EA zeigte jedoch nur einen Anteil von 11,16 %. Die Elementaranalyse ist wesentlich genauer als die EDX-Analyse, daher muss der Fehler beim EDX-Verfahren liegen. Durch den Fehler sind auch die anderen Prozente der EDX-Analyse fehlerhaft, was den deutlich niedrigeren Calcium und Phosphoranteil erklärt. Das molare Ca/P Verhältnis bleibt aber gleich (EDX 2,56 und EA 2,4). Des Weiteren besteht bei der EDX-Analyse immer noch das Problem mit dem sehr intensiven Silicium-Signal. Es sorgt dafür, dass ein großer Anteil (speziell Ca und P) der anderen vorhandenen Elemente nicht korrekt erfasst wird.

Tabelle 28 - Elementanalyse der GDNT-P-Nanopartikel

EA-Untersuchungen der GDNT-P-Nanopartikel	
	Mittelwert (%)
	zentrifugiert
C	11,16
O (nicht in PO_4^{3-})	13,45
O	43,84
Ca	27,28
PO_4^{3-}	45,30
P	14,71
N	0,13
H	2,68
Ca/P (molar)	2,40
Ca/P (alle)	1,85

Die Nanopartikel haben hier ein Ca/P Verhältnis von 1,85. Da aber auch ein gewisser Prozentsatz des Phosphates dem Lipid zugeordnet werden muss, kann der Wert nicht als korrekt betrachtet werden. Wenn der gesamte Kohlenstoff als Lipid betrachtet wird, müsste für eine genaue Berechnung des Ca/P Verhältnisses aber bekannt sein, wie viele OH-Gruppen durch Phosphat ausgetauscht wurden. Da dies nicht der Fall ist, kann die Messung der EA nicht korrigiert werden. Der anorganische Anteil ist mit ca. 73 % sehr hoch und sollte durch die TG-Messung bestätigt werden. Das molare Verhältnis sollte somit nahezu identisch zu dem molaren Verhältnis von 2,0 der GDNT-CaP-Nanopartikel sein.

4.8.4.3 Charakterisierung der GDNT-P-CaP-Nanopartikel über TG

Die TG-Analyse der GDNT-P-CaP-Nanopartikel bestätigt das Ergebnis der Elementaranalyse. Nach der TG-Prozedur sind von den 21,5 mg noch rund 75 % der Masse vorhanden. Im Wesentlichen lässt sich das TG-Diagramm (Abbildung 4.101) in vier Bereiche einteilen. Der erste Bereich zeigt einen prozentualen Abfall der Masse um 1,6 %. Es schließt sich der zweite Abfall der Masse von 6,6 % an, welcher zwischen 75 °C und 190 °C abläuft. Der dritte Massenverlust läuft zwischen 190 °C und 550 °C ab und beträgt 12 %. Der vierte Bereich des Diagramms zeigt einen Massenverlust von 4,1 %, der zwischen 550 °C und 940 °C abläuft. Das IR-Spektrum (Abbildung 4.102) zeigt das Entstehen von Wasser und CO₂, was auf das Zersetzen der organischen Komponente hinweist. Über den gesamten TG-Zeitraum ist das IR nahezu identisch. Die Intensität der Adsorption nimmt zum Ende der TG hin zu. Die TG ist nach dem verwendeten Zeitraum noch nicht vollständig abgeschlossen, da die Intensität der IR-Banden den Nullpunkt noch nicht erreicht hat.

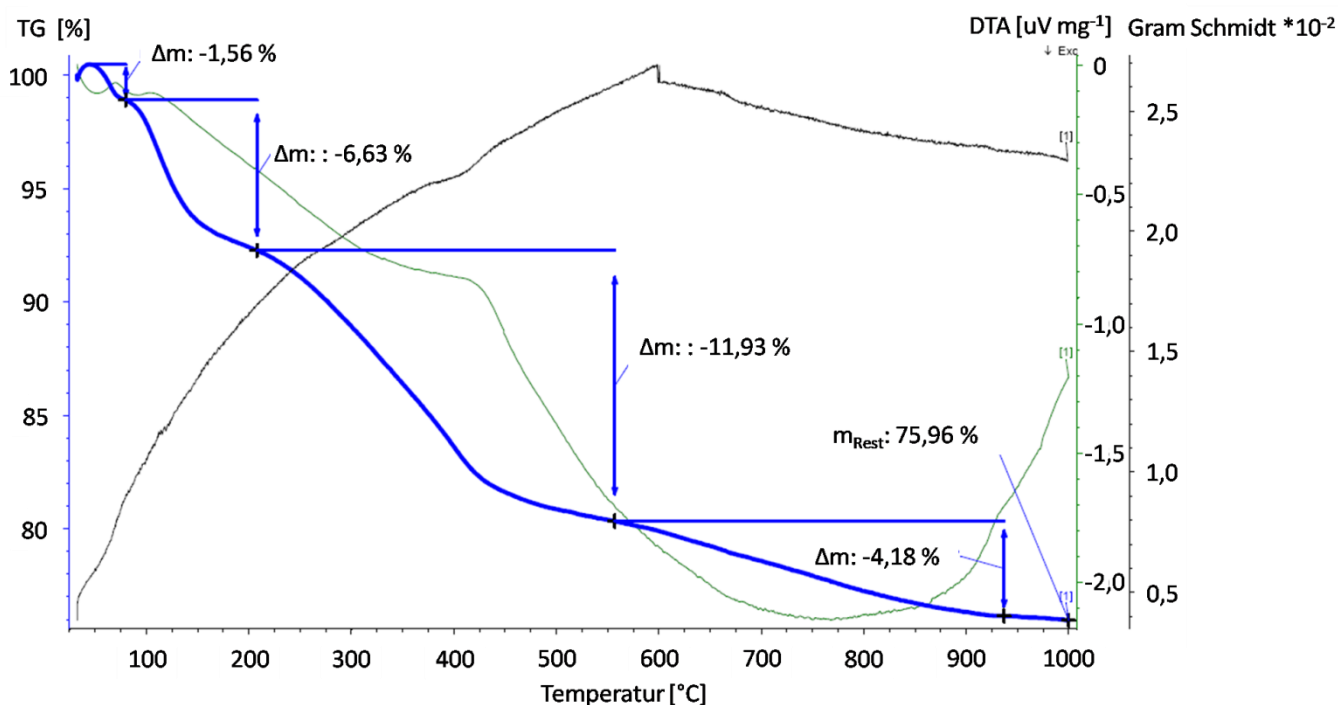


Abbildung 4.101 - TG-Kurve der GDNT-P-CaP-Nanopartikel

Aus dem IR-Spektrum folgt, dass nicht die vollständige Masse an organischer Komponente zersetzt worden ist. Es wäre also sinnvoll noch weitere TG-Untersuchungen in einer O₂-Atmosphäre oder bei höheren Endtemperaturen durchzuführen. Die Auflösung der Gewichtsverlustkurven könnte auch verbessert werden. Sie sind nicht sehr deutlich ausgeprägt.

4.8 Stabilisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel in verschiedenen Medien über ein phosphoryliertes Tetraetherlipid

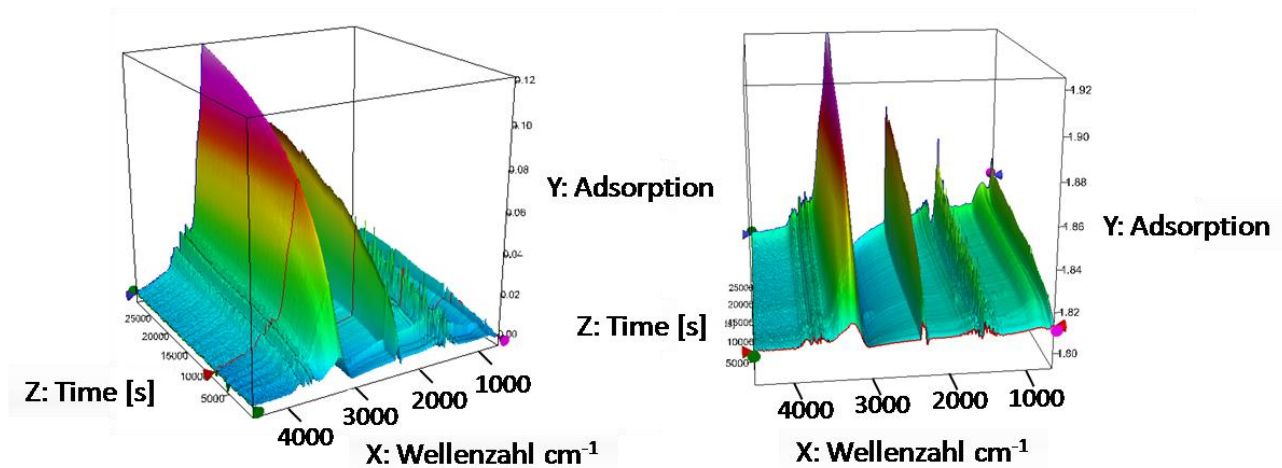


Abbildung 4.102 - IR-Spektrum zur TG-Kurve der GDNT-P-CaP-Nanopartikel nach ~10.000s Messzeit

4.8.4.4 Charakterisierung der GDNT-P Nanopartikel über IR

In diesem Kapitel werden die IR-Spektren von GDNT-P und GDNT-P-Kolloiden sowie GDNT-P und GDNT gezeigt und diskutiert.

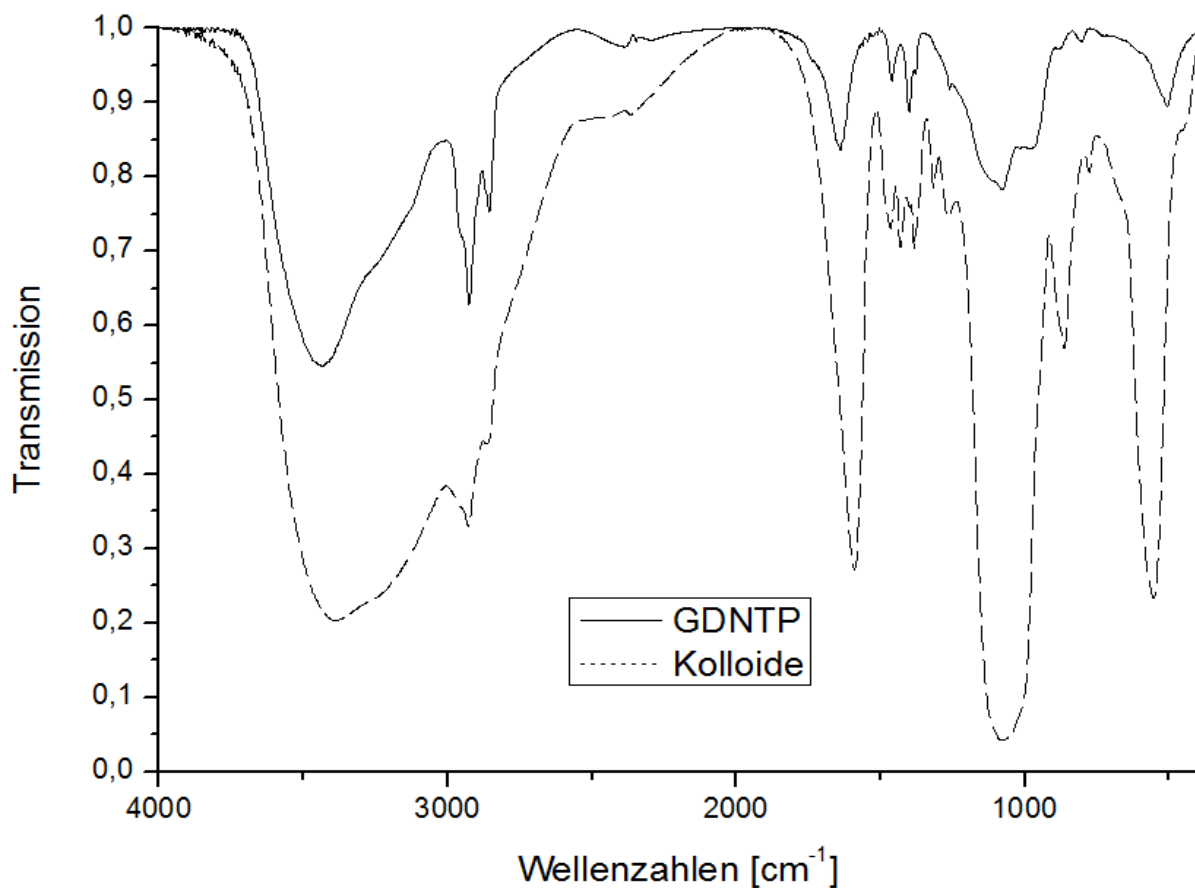


Abbildung 4.103 - IR-Spektren des GDNT-P und der Kolloide gegenüber dargestellt

Abbildung 4.103 zeigt die IR-Spektren von GDNT-P und den daraus erstellten Nanopartikeln übereinander dargestellt. Es ist kein eindeutiger Beweis für die

4 Ergebnisse und Diskussion

4.9 Funktionalisierung der GDNT-P-Calciumphosphat-Nanopartikel durch verschiedene Proteine

Anwesenheit von Calciumphosphat möglich, da das Lipid schon Phosphatbanden hat. Daher können diese Banden nicht als Beweis für die Anwesenheit von Calciumphosphat gewertet werden. Hier zeigt sich, dass bei der Fällung, genau wie bei den GDNT-Nanopartikeln auch, Lactat aus der Calciumlösung eingebaut wird. Allerdings steht die gute Löslichkeit von Calciumlactat dazu im Widerspruch. In der folgenden Tabelle 29 werden die IR-Signale beider Spektren gegenübergestellt und die Signale zugeordnet. Alle Signale lassen sich zuordnen und passen zu den erwarteten Banden.

Tabelle 29 - Auflistung der IR-Banden von GDNT-P mit und ohne Calciumphosphat-Zugabe

Auswertung der IR-Spektren von GDNT-P und den GDNT-P-CaP-Kolloiden				
cm ⁻¹	GDNT-P	Kolloid	Gruppe	Schwingungstyp
3400	ja	ja	O-H	Valenzschwingung
2920	ja	ja	CH ₂	Valenzschwingung
2860	ja	ja	CH/CH ₃	Valenzschwingung
1622	ja		H ₂ O	
1582		ja	Lactat	
1450	ja	ja	CH ₂ /C-O	Deformationsschwingung
1425		ja	CH ₂ /C-O/O-H	Deformationsschwingung
1394	ja	ja	CH ₃ /C-O/O-H	sym. Deformationsschwingung
1240	ja	ja	C-O	Valenzschwingung
1050	ja	ja	C-O/P-O-Alkyl	Valenzschwingung
950	ja		P-O-P	
856		ja	CH ₂	<i>rocking</i> Schwingung

4.9 Funktionalisierung der GDNT-P-Calciumphosphat-Nanopartikel durch verschiedene Proteine

Die GDNT-P-Calciumphosphat-Nanopartikel wurden, wie die GDNT-Calciumphosphat-Nanopartikel auch, durch die Proteine BSA, Ubiquitin und Lysozym funktionalisiert. Hierzu wurden 10 mL der frisch angesetzten Nanopartikeldispersion nach dem Rühren mit einer Proteinlösung versetzt und 30 min gerührt. Das Volumen der Proteinlösungen betrug 0,1 / 0,2 / 0,3 / 0,4 mL einer 1 g L⁻¹-Lösung. Die Ergebnisse der DLS zeigten entweder Agglomerate (ein Größensignal bei über 1000 nm) oder sie konnten nicht

4 Ergebnisse und Diskussion

4.9 Funktionalisierung der GDNT-P-Calciumphosphat-Nanopartikel durch verschiedene Proteine

ausgewertet werden, da die Ergebnisse der DLS nicht zuverlässig waren (*Cumulants fit*, sehr hoher PDI). Die Partikel wurden 35 min bei 30.000 Umdrehung zentrifugiert, um die Agglomerate und Proteinreste von den Partikeln abzutrennen. Die REM-Bilder der Partikel nach der Funktionalisierung zeigten unterschiedliche Ergebnisse, aber bei allen drei Proteinen zeigte der Ansatz mit der höchsten Proteinkonzentration auch die besten Ergebnisse. BSA zeigte bei der 0,1 mL Probe keine Nanopartikel oder ähnliches. Die Proben mit 0,2 und 0,3 mL BSA-Zugabe zeigten massive Agglomeratbildung, Nanopartikel wie vorher (Abbildung 4.104 links), und auch neue Morphologien der Nanopartikel. Das REM-Bild in Abbildung 4.104 (rechts) zeigt repräsentativ diese nicht sphärischen, sondern länglichen Partikel.

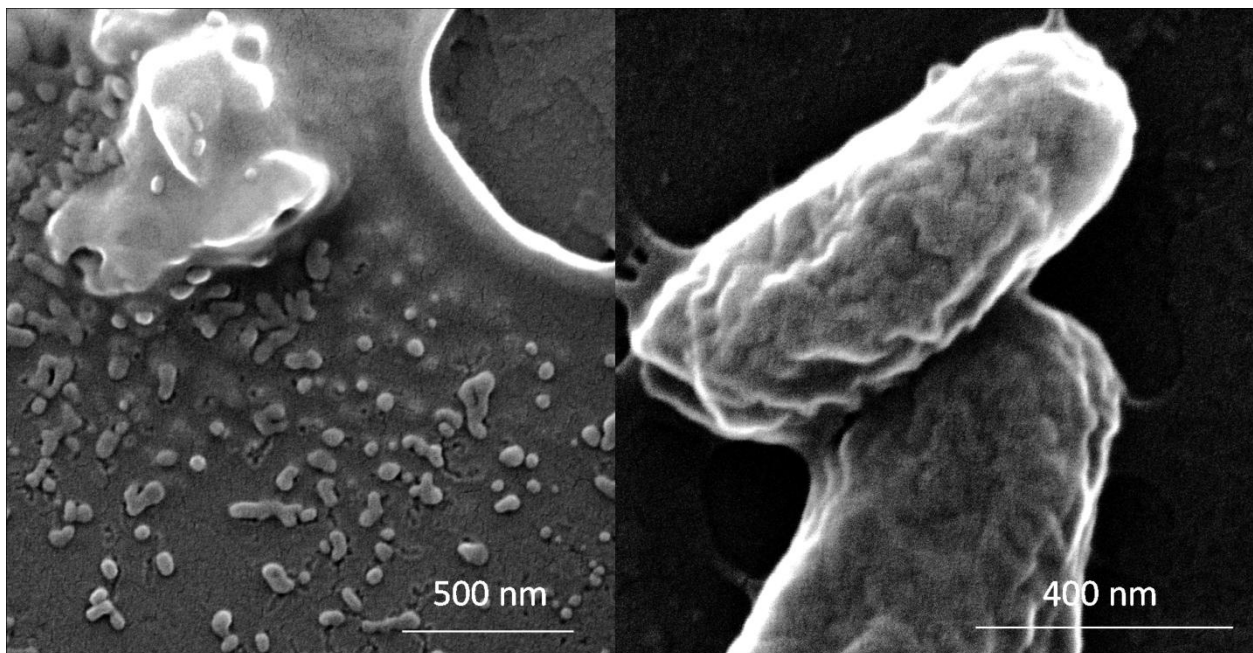


Abbildung 4.104 - REM-Aufnahmen der GDNT-P-CaP-Nanopartikel mit BSA 0,2 mL

Die 0,4 mL Proben zeigten Agglomerate und auch kleine monodisperse, nicht verwachsene Nanopartikel. Die länglichen Partikel waren nicht mehr zu sehen.

Die Ubiquitin-Reihe zeigte bei der 0,1 mL Probe ähnliche REM-Bilder wie die Bilder in Abbildung 4.104, aber die länglichen Partikel waren 1 µm groß. Bei den 0,2 und 0,3 mL Proben waren nur Agglomerate und NaCl-Kristalle sichtbar. Die Probe mit 0,4 mL BSA zeigte wie die Proben 0,1-0,3 mL ähnliche Agglomerate, Kristalle und die langen Stäbchen, welche allerdings jetzt mehrere µm lang sind. Neben diesen Morphologien sind aber auch kleine monodisperse nicht verwachsene Nanopartikel sichtbar.

Die Lysozym-Reihe zeigte für die 0,1 mL Probe alle oben genannten Strukturen. Keine scheint eine primäre Struktur zu sein, alles liegt unspezifisch gemischt vor. Die Probe mit 0,2 mL zeigte stark verwachsene Nanopartikel neben den üblichen Agglomeraten.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.9 Funktionalisierung der GDNT-P-Calciumphosphat-Nanopartikel durch verschiedene Proteine

Die 0,3 mL Lysozym-Probe zeigte wieder keine spezifischen Morphologien, sondern ein Gemisch aus allen. Wie bei den anderen Proteinen auch, bildete sich bei der Probe mit einer Zugabe von 0,4 mL-Proteinlösung eine sehr kleine monodisperse Nanopartikelschicht aus, neben der auch wieder Agglomerate und Kristalle vorlagen. Abbildung 4.105 zeigt die Proben der GDNT-P-CaP-Protein-Nanopartikel, welche mit den drei verschiedenen Proteinen (Zugabe von 0,4 mL Proteinlösung) funktionalisiert wurden.

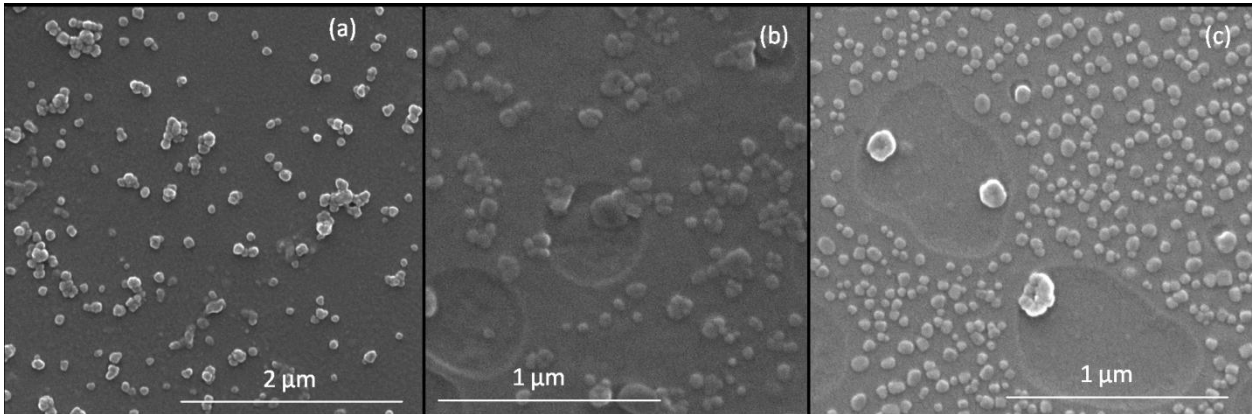


Abbildung 4.105 - REM-Aufnahmen der funktionalisierten GDNT-P-CaP-Nanopartikel mit je 0,4 mL Proteinlösung versetzt.

Abbildung 4.105 (a) zeigt die mit Lysozym funktionalisierten CaP-GDNT-P Nanopartikel. Sie sind Radien zwischen 20 und 45 nm, selten über 50 nm groß. Die über BSA funktionalisierten CaP-GDNT-P Nanopartikel sind etwa doppelt so groß, aber sehr monodispers, sie sind zwischen 45 und 57,5 nm groß. Siehe dazu auch Abbildung 4.105 (b). Die Ubiquitin-CaP-GDNT-P Nanopartikel zeigen neben den einzelnen Nanopartikeln, die 20 bis 37,5 nm groß sind, auch Agglomerate, die aus weniger als ca. 10 Nanopartikeln zusammengesetzt sind (Abbildung 4.105 (c)).

In Anlehnung an die Berechnung der Nanopartikelbeladung (Kapitel 4.2.6) soll auch hier die mögliche Ausbildung einer Monolage des Proteins auf der Nanopartikeloberfläche bestimmt werden. Die GDNT-P-CaP-Nanopartikel mit BSA funktionalisiert zeigen eine 12,67 % bis 16,19 % ausgebildete Monolage oder eine 14,35 % bis 20,63 % statistische Beladung der Partikel. Bei der Zugabe von Lysozym zeigt sich eine 2,14 % bis 4,82 % ausgebildete Monolage oder eine 2,73 % bis 6,14 % statistische Beladung der Partikel. Für Ubiquitin liegen die Werte der ausgebildeten Monolage zwischen 1,06 % und 1,98 %, bei der statistischen Beladung zwischen 1,35 % und 2,53 %.

4.10 Redispergierbarkeit der GDNT-P-Calciumphosphat-Nanopartikel in Wasser

Selbst unter Berücksichtigung der Ungenauigkeiten (Kapitel 4.2.6) in den obigen Berechnungen ist zu erkennen, dass für eine stabile Beladung der Nanopartikel keine Monolage nötig ist. Höhere Proteinzugabemengen führten zur Agglomeratbildung.

4.10 Redispergierbarkeit der GDNT-P-Calciumphosphat-Nanopartikel in Wasser

In den letzten Versuchen der Arbeit wurde die Redispergierbarkeit der GDNT-P-Calciumphosphat-Nanopartikel in Wasser getestet. Ein 40 mL Isopropanolansatz wurde im Trockenschrank über 2 Tage bei 60 °C auf 3-4 mL eingedampft. Dies hatte zwar ein Ausflocken der Partikel zur Folge, jedoch wurde festgestellt, dass diese relativ unproblematisch in Wasser redispergiert werden konnten. DLS-Messungen ergaben für die Zugabe von 5 / 10 / 15 / 20 mL Wasser und 1 min Ultraschallbad-Behandlung einen stark abnehmenden Durchmesser der Partikel. Dieser nahm von >1000 (5 mL) / 577 (10 mL) / 424 (15 mL) / 353 (20 mL) nm ab.

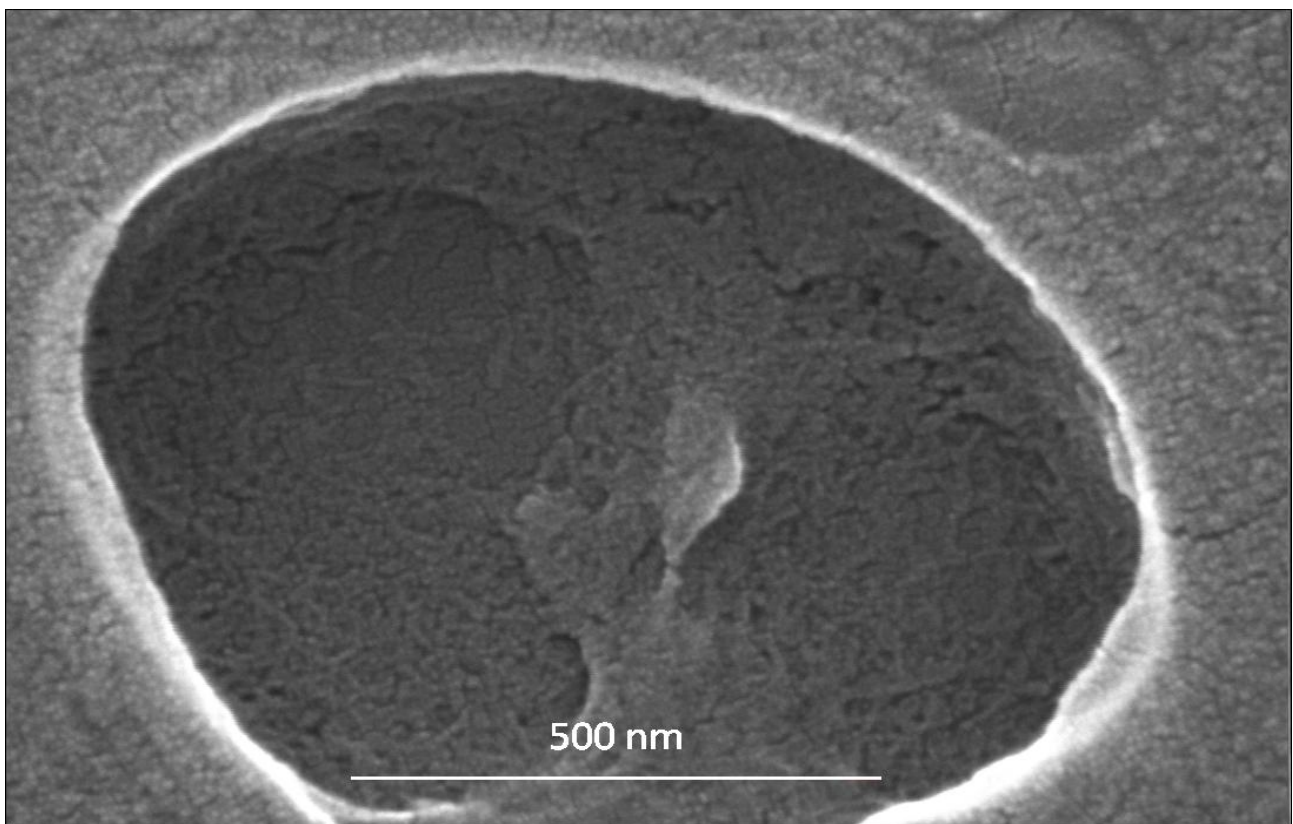


Abbildung 4.106 - REM-Aufnahme der in Wasser redispergierten GDNT-P-CaP-Nanopartikel

Es ging in dem Zeitraum nicht der gesamte Feststoff wieder in Lösung, daher zeigten sich im REM Agglomerate, aber auch extrem kleine Nanopartikel, die fast nicht mehr erkennbar waren (Abbildung 4.106). Diese Morphologie der REM-Proben zeigte sich in allen vier Proben und ist daher als repräsentativ anzusehen. Es waren primär nur diese Partikelstrukturen sichtbar, kaum Nanopartikel mit einer Größe über 20 nm.

EDX-Messungen stellten sicher, dass es sich nicht um die Bedampfungsschicht aus Gold und Palladium, sondern um Calciumphosphat-Nanopartikel handelte. Es konnte ein Calcium und Phosphatsignal gemessen werden, das deutlich von dem Siliciumsignal durch den Wafer unterscheidbar war.

Die Nanopartikel-Proben hatte nach der Ultraschallbehandlung eine sehr starke Trübung, wesentlich stärker als bei allen vorherigen Experimenten. Die GDNT-Nanopartikeldispersionen waren nahezu klar, die des GDNT-P-Nanopartikeldispersionen zeigten nur eine leichte Trübung

Zusammenfassend sind diese Partikel ca. 10 nm groß und reproduzierbar. Es hat den Anschein, als würden die Nanopartikel nicht einzeln vorliegen, sondern lagern sich zu großen Strukturen zusammen (REM-Bilder). Sie sind so in die Agglomerate eingebettet.

In diesen Nanopartikeln steckt definitiv noch Potential für weitere Forschungen, denn bei einem erfolgreichen Redispergieren der Partikel in Wasser würden sich viele Probleme lösen.

5 Stand der Literatur, Zusammenfassung, Abschlussdiskussion, Ausblick

5.1 Stand der Literatur

Die Einordnung der Arbeit in die Literatur ist schwierig, da die Literatur zu den Tetraetherlipiden sich entweder auf die Charakterisierung, Reinigung und Untersuchung der Strukturen beschränkt^[43,44,58,60-63,65-69,99-103] oder sich mit den Anwendungsbereichen, wie in Kapitel 3.5.5 beschrieben^[58,60,61,71,74-80], befasst. Tetraetherlipide dienen bis zum heutigen Zeitpunkt nicht zur Stabilisierung und/oder Funktionalisierung von Nanopartikeln. Lipide hingegen werden genutzt, um Nanopartikel zu bilden oder zu stabilisieren^[105-108], aber in wässrigem Medium ist diese Anwendung nicht ohne Weiteres möglich. Wenn der polare Kopf des Lipides sich an den polaren Kern des Nanopartikels anlagert, so muss der hydrophobe Teil ins Wasser ragen. Dies ist ungünstig und führt zwangsläufig zur Agglomeration der Systeme. Einige Artikel beschäftigen sich auch mit stabilisierten Liposomen^[109,110], weiterhin werden Lipid-Nanopartikel für *Drug delivery* Systeme^[110-112] genutzt. Ein anderer wichtiger Aspekt der Lipid-Nanopartikel-Thematik ist die Erforschung sogenannter *Solid Lipid Nanoparticles*^[112-124], welche seit 2007 die Veröffentlichungen zu dem Thema Lipide dominiert. Diese Anwendungen nutzen jedoch keine Tetraetherlipide, was sogar eine Verkleinerung der meisten hergestellten Nanopartikel ermöglichen würde, da der GDNT in Wasser ~50 nm Vesikel bildet. Die meisten Ausgangsliposomen, von denen in der Literatur die Rede ist, sind deutlich über 100 nm groß^[113-116,119,120]. Es existieren auch Forschungsprojekte zum Thema Lipide die sich mit dem Fetttransport des menschlichen Körpers und damit mit Lipoproteinen^[125] beschäftigen, was wiederum sehr weit von dem gesetzten Thema wegführt.

Zur Synthese von Nanopartikeln werden mannigfaltige Substanzen genutzt und mit ebenso vielen verschiedenen Substanzen funktionalisiert. Der Fokus der Einordnung soll hier daher auf der Verwendung von Calciumphosphaten liegen. Mit der Verwendung von Calciumphosphaten als Nanopartikel oder Kristallisationskeim beschäftigen sich viele Wissenschaftler. Hierzu werden verschiedene Polymere^[82,96,126-134], Polyaminosäuren^[131,135-137], DNA und ihre Derivate^[126,138-146], Proteine (hier BSA)^[147,148] und andere Substanzen^[104,127,149-155] verwendet. Andere Gruppen verwenden Calciumphosphat-Partikel, um deren Einfluss auf Osteoklasten und

Osteoblasten^[5,29,128,141,156-158] oder andere Zelltypen^[139-141,159] zu untersuchen. Auch dienen die Calciumphosphat-Systeme der Untersuchung der Wirkstofffreisetzung verschiedener Substanzen^[81,105,150,160]. Es gibt nur wenig Literatur zur Anlagerung von Proteinen an Nanopartikel, vor allem im Bezug auf Calciumphosphate. Daher ist die Arbeit im neuen Bereich der Forschung anzusiedeln.

Ein anderer Schwerpunkt bei Calciumphosphat-Nanopartikel-Systemen liegt auf dem Einfluss von Substanzen auf die Kristallisation der Calciumphosphate^[129,137,151,152,155,161-169]. Es wurden hier primär Polyaminosäuren und Polymere betrachtet, aber auch andere ähnliche Substanzen. Des Weiteren werden Calciumphosphate mit Substanzen dotiert, um bestimmte Eigenschaften zu erreichen, wie beispielsweise Lumineszenz oder Fluoreszenz^[170-172].

Die in meiner Arbeit verwendeten Proteine Lysozym^[173-182], BSA^[176,177,183-186] oder Ubiquitin werden für andere anorganische Nanopartikel verwendet. Hier sind vor allem Gold^[181,183-187] und Siliciumoxid^[177,178] wichtig. Neben ihnen existieren noch viele andere Nanopartikel, welche überwiegend aus Metalloxiden wie Eisenoxid^[174,176], Titanoxid^[177], Aluminiumoxid^[177], Zirkoniumoxid^[177] und Calciumcarbonat^[127,179,180] bestehen. Nanopartikel aus organischen Substanzen^[173,175,182] verwenden ebenfalls diese Proteine zur Stabilisierung. Auch der Einfluss der Beschichtung von Titanoberflächen mit BSA und Lysozym auf das Anlagern von Zellen wurde untersucht^[188,189].

Wie schon weiter oben erwähnt, dienen neben Calciumphosphat auch viele andere anorganische Komponenten zur Nanopartikelherstellung. Diese werden auch mit zahlreichen Substanzen stabilisiert oder funktionalisiert, die ähnlich zu den in der Dissertation verwendeten Substanzen sind. Darunter fallen andere Polyaminosäuren^[131,172,190], Proteinen^[190-201], sowie DNA-Derivate^[142,143,202]. Interessant sind die Anlagerungen dieser Substanzen an Gold-^[187,190,194,202-204] und Silber-^[187,195,198,205] und Silicium(oxid)nanopartikel^[142,172,178,193,197,200,201,205,206] da diese Systeme eine gute Biokompatibilität besitzen. Des Weiteren werden auch Calciumcarbonate^[143], Titanoxid^[187], Eisenoxid^[131,176,187], Kohlenstoff-^[191,196] und Nickel/Nickeloxid-Nanopartikel^[187,199] verwendet. Viele andere Metalle die zur Nanopartikel Herstellung dienen, besitzen toxische Eigenschaften und werden hier nicht weiter erwähnt. Auch sind Halbleitereigenschaften oder ähnliches hier nicht von Bedeutung. Es gibt auch Nanopartikel-Systeme die organische Substanzen für die Synthese der Nanostrukturen verwenden^[106,110,113,173,192,207-210]. Auch hier soll das Augenmerk auf der Ähnlichkeit zur

Arbeit liegen, daher wurden Literaturstellen gelesen, die Nanopartikelsysteme mit Polymeren^[110], Polyaminosäuren^[207], Proteinen^[192,209] und DNA-Derivaten stabilisieren^[210] und/oder funktionalisieren.

Die in der Arbeit erzielten Ergebnisse lassen sich kaum mit denen aus der Literatur vergleichen, da es kaum Schnittpunkte zwischen den verschiedenen Arbeiten gibt. Nanopartikel die mit den Zielproteinen BSA und Lysozym funktionalisiert wurden existieren im wesentlichen mit Goldkernen. Diese Goldnanopartikel können sehr klein synthetisiert werden: 1-7 nm^[181,183,184]. Somit sind sie eine starke Konkurrenz zu den in der Arbeit hergestellten Partikeln im Focus der Partikelgröße. Je nach Methode können Gold-BSA-Partikel mit einer Größe von 4 bis 50 nm^[184], aber auch über 500 nm^[183], synthetisiert werden. Lysozym scheint die Gold-Partikel deutlich besser und schneller zu stabilisieren. Die hier synthetisierten Gold-Nanopartikel sind ohne Lysozym 5-20 nm groß. Wird es bei der Synthese hinzugegeben, so entstehen 2 bis 3 nm große Partikel^[181]. Im Vergleich zu diesen Partikeln sind die Calciumphosphat-Lipid-Protein-Partikel der Arbeit jedoch verhältnismäßig groß. Gegen organische Nanopartikel wie beispielsweise Poly- ϵ -caprolacton^[10] oder Lecithin-Protein-Partikel^[175] sind die Calciumphosphat-Lipid-Lysozym-Partikel wiederum klein. Hier wurden in beiden Fällen nach der Funktionalisierung ~200 nm große Partikel synthetisiert. Gleiches gilt für das Silbernanopartikelsystem von *Vigneshwaran et al.*^[198], welches vor der Funktionalisierung mit einem Pilz-Protein 30 nm und danach 280 nm große Nanopartikel ergab.

Die Größe der Partikel stellt allerdings nicht den einzigen interessanten Fakt dar, denn die Proteine müssen effizient angelagert werden und sollten auch ihrer Funktion nachgehen können. Dazu ist es nötig, diese Proteine von den Nanopartikeln zu lösen, was üblicherweise durch Auflösen des Partikels erfolgt. Dies ist bei Gold- oder Silbersystemen schwierig. *Peng et al.*^[176] gelang eine Adsorption von BSA und Lysozym an 10 nm große Fe₃O₄-Nanopartikel. Die durchgeführten Freisetzungsexperimente ergaben für das eingesetzte BSA eine 50 %ige Freisetzung durch Zugabe von Na₂HPO₄ oder NaH₂PO₄ (beide 0,5 M). Durch Variationen des pH-Wertes zwischen 5 und 11 konnte nur eine 10 %ige Freisetzung erreicht werden. Von dem eingesetzten Lysozym konnte mit den obigen Salzlösungen auch bis zu 50 % freigesetzt werden. Beide Proteine wurden dazu 2 h mit den Salzlösungen inkubiert. Veränderungen des pH-Wertes (5 bis 11) ermöglichten eine 60 %ige Freisetzung von Lysozym. Die Aktivität betrug nach der Freisetzung noch 80 %.

Siliciumoxid-Nanopartikel^[178] zeigen in Abhängigkeit zur Ausgangspartikelgröße eine fallende Lysozym-Adsorption. *Vertegel et al.* untersuchten 4, 20 und 100 nm große Siliciumoxid-Nanopartikel. Hier zeigte sich, dass 17 % der 4 nm Nanopartikeloberfläche mit Lysozym beschichtet werden konnte. Bei den 10 nm Partikeln waren es 14 % bis 22 %. Für die 100 nm Partikel lag die Oberflächenbeschichtung bei 6 % bis 11 %. Die Aktivität des angelagerten Proteins lag bei ca. 60 % (4 nm), ca. 50 % (20 nm) und ca. 40 % (100 nm).

5.2 Zusammenfassung, Abschlussdiskussion, Ausblick

Zu Beginn der Arbeit wurden Experimente zur Stabilisierung von Calciumphosphat Nanopartikeln mit Polyaminosäuren (PAsp und PLys) durchgeführt. Hier kristallisierte sich heraus, dass verschiedene Kettenlängen der Aminosäuren keinen Einfluss auf die Partikelgröße haben, aber längere Ketten zu einheitlicheren DLS Ergebnissen führten. Im REM zeigten sich bei der PAsp-Reihe unter optimalen Bedingungen sphärische Nanopartikel mit einem Radius von 150 bis 250 nm. Das Polylysin bildete im optimalen Bereich kristalline Partikel, die 200 bis 300 nm groß waren. Die ζ -Potentiale lagen der Partikel lagen bei -18 mV (PAsp) und +30 mV (PLys). Dies bedeutet, dass die Polyaminosäuren eine gute statische Stabilisierung des Calciumphosphates erreichen konnten. Wegen des proteinähnlichen Aufbaues der Polyaminosäuren wurden Versuchsreihen mit Proteinen angesetzt, die das Calciumphosphat stabilisieren und gleichzeitig funktionalisieren sollten. Bei ähnlichen Bedingungen konnten allerdings alle drei eingesetzten Protein-Reihen (BSA, Ubiquitin und Lysozym) keinen Erfolg erzielen. Offensichtlich verhinderten die unterschiedlichen Ladungen der Proteinoberfläche sowie das Bilden von Knäueln in Lösung eine Anlagerung an das Calciumphosphat. Gleichzeitig wurde das Anlagern von mehreren Kristallisationskeimen an die Proteinoberfläche ermöglicht, was eine Agglomeration nach sich zog. Ein Linker ist also nötig, damit das Anlagern der Proteine an die Calciumphosphatoberfläche erfolgen kann. Hierzu wurde GDNT verwendet, welches zuvor charakterisiert wurde. Hierbei stellte sich heraus, dass es aus drei gleich großen Strukturen besteht, die noch aus verschiedenen Isomeren zusammengesetzt sind. Dieses Lipid konnte mit den Calcium- und Phosphatlösungen in Wasser keine stabilen Partikel bilden, da das Lipid in Wasser vor der Calciumphosphatzugabe Vesikel bildet. Die Übertragung der Experimente in Ethanol löste dieses Problem. Es bildeten sich keine Vesikel mehr, folglich konnte das

Lipid nun die entstehenden Kristallisationskeime des Calciumphosphates umschließen. So konnten Nanopartikel mit einer Größe zwischen 40 und 90 nm hergestellt werden, die mehrere Monate in Dispersion stabil waren. Die Reinigung und Charakterisierung war aufgrund der niedrigen Konzentrationen sehr schwierig, genau wie die teilweise erfolgreiche Funktionalisierung mit den obigen Proteinen. Dieses Problem konnte mit einer Modifizierung des Lipides beseitigt werden. Das GDNT-P ermöglichte die Synthese von monodispersen Partikeln, welche eine Größe von 40 nm besaßen und in Wasser redispergierbar waren. Es bildeten sich Nanopartikel von ca. 10 nm Größe. Die Partikel konnten vor dem Redispergieren ebenfalls mit BSA, Ubiquitin und Lysozym funktionalisiert werden.

Im vorherigen Kapitel 5.1 wurde schon erwähnt, dass es in der Literatur nur wenige Experimente zu Lipiden gibt, die mit den Experimenten in der Arbeit verglichen werden können. Die in der Arbeit dargestellten Calciumphosphat-GDNT und -GDNT-P-Nanopartikel haben im Vergleich zu anderen Nanopartikel-Systemen, die Proteine als Funktionalisierungssubstanz nutzen^[173,175,198], einen Vorteil durch das Ausbilden kleinerer Nanopartikel. Im Fokus der Proteinaktivität und Freisetzung könnten die leicht abbaubaren Calciumphosphate ebenfalls vorteilhaft sein. Es bestehen gute Aussichten, dass bei einer effizienten Proteinbeladung der Calciumphosphat-Lipid-Nanopartikel interessante Weiterführungen des Projektes möglich werden. Zunächst sollte jedoch die Beladungseffizienz über Experimente ermittelt werden, genau wie die Freisetzungseffizienz in Zellen. Hierzu müsste die Proteinaktivität nachgewiesen werden. Dies ist besonders interessant für die Calciumphosphat-GDNT-P-Partikel, welche mit den Partikelgrößen 40 nm reproduzierbar dargestellt werden konnten. Hier könnte die Abhängigkeit der Beladung/Freisetzung von der Partikelgröße untersucht werden. Auch die in Wasser redispergierten scheinbar nur ca. 10 nm großen Nanopartikel können weiter untersucht werden.

Interessant ist auch eine Stabilität der Nanopartikel gegenüber Veränderungen des pH-Wertes. Diese sollte getestet werden, da das Lipid das Calciumphosphat bei sehr niedrigen pH-Werten vor dem Auflösen bewahren könnte. Viele der hyperthermophilen Bakterien, die das Lipid synthetisieren, leben in sehr saurer Umgebung. Hier lässt sich dann sofort eine weitere Idee umsetzen, denn da sich das ζ -Potential der Partikel und Proteine in Abhängigkeit des pH-Wertes ändert, kann die Ladung auf der Oberfläche beider Reaktionspartner so modifiziert werden, dass sich beide leichter und stabiler anlagern können. Lysozym ist ein Protein, dessen Ladung wenig vom pH-Wert abhängt,

aber BSA hingegen zeigt sehr unterschiedliche Ladungen bei den verschiedenen pH-Werten^[177]. Die Ladung von BSA ist, absolut betrachtet, im sehr sauren pH-Bereich betragsmäßig fünfmal und bei sehr alkalischen pH-Werten siebenmal so hoch wie die des Lysozyms. Dies könnte die Stabilität der gebildeten Nanopartikel erhöhen, da Partikel mit einem hohen ζ -Potentialbetrag stabiler sind als Partikel mit niedrigen ζ -Potentialbeträgen.

Außerdem können auch die Lipide in wässriger Lösung zur Forschung an den sogenannten *Solid Lipid Nanoparticles* genutzt werden, da die Tetraetherlipide verhältnismäßig kleine Lipidvesikel bilden.

Letztlich kann auf ein erfolgreich umgesetztes Ziel zurückgeblickt werden. Die Nanopartikel-Stabilisierung über Lipide und Polyaminosäuren, sowie das Funktionalisieren der Partikel über Proteine verlief erfolgreich.

6 Anhang

6.1 Verwendete Chemikalien

Name	R-Sätze	S-Sätze	Gefahrstoff- symbol	Hersteller	Entsorgung
Ca-L-Lactat	-	-	-	Fluka	*
(NH ₄) ₂ HPO ₄	-	-	-	Merck	
HCl	34-37	26-36/37/39-45	C	Riedel-de-Haën	*
NaOH	35	26-37/39-45	C	VWR	
H ₂ SO ₄	35	26-30-45	C	Fischer Scientific	
H ₂ O ₂	22- 37/38-41	2-17-26-28- 36/37/39-46	C, Xn	Merck	
EDTA	-	-	-	Waldeck GmbH	*
NaHCO ₃	-	-	-	Appli-Chem	
KBr	-	-	-	Merck	***
CDCl ₃	-	-	Xn	Aldrich	**
Isopropanol	11-36-67	7-16-24/25-26	F, Xi	VWR	
Ethanol (p.a.)	11	7-16	F	VWR	
Ethanol (p.a., vergällt)	11	7-16	F	Riedel-de-Haën	
Polyasparaginsäure als Natriumsalz (5-15 kDa)	-	-	-	Sigma	*
Polyasparaginsäure als Natriumsalz (15-30kDa)	-	-	-	Sigma	
Polylysin als Hydrobromid (4-15 kDa)	-	-	-	Sigma	
Polylysin als Hydrochlorid (15-50 kDa)	-	-	-	Sigma	
BSA	-	-	-		
Ubiquitin	-	-	-	Sigma	
Lysozym chlorid, Grad VI			-	Sigma	
NaCl			-	Merck	
GDNT			-	iba	*
GDNT-P			-	iba	

* wurden dem Abwasser zugegeben (nach dem Neutralisieren, wenn nötig),

** Lösungsmittelabfälle, *** Anorganische Feststoffabfälle

6.2 Danksagung

Allen voran möchte ich natürlich Herrn Prof. Dr. M. Eppe für das Ermöglichen der Dissertation, die Diskussionen über die Arbeit und die Teilnahme an zwei DAAD Projekten (Bologna und Bristol) herzlich danken.

Ich möchte meinen Kollegen im Arbeitskreis von Prof. Eppe danken. Alle Doktoranden, besonders Herr Dipl.-Chem. Thorsten Peitsch, haben stets ein offenes Ohr für theoretische und praktische Probleme gehabt. Auch wenn die Messgeräte oder Computer nicht auf mich hörten, wurde ich nie im Stich gelassen.

Besonderer Dank geht hier an die Dipl.-Chem. Dirk Mahl und Jan Klesing für das Korrigieren meiner Dissertation.

Natürlich sollte an dieser Stelle auch das sehr kollegiale Verhalten aller Doktoranden und fast aller technischen Angestellten betont werden. Ich habe die Zeit im Arbeitskreis stets genossen und erinnere mich an viele schöne kleine Geschichten aus dem Labor.

Besonders möchte ich den technischen Angestellten Herrn Smail Boukercha für die gute Betreuung am REM und Frau Ursula Giebel für zahllose Kleinigkeiten danken.

Auch danken möchte ich Prof. Dr.-Ing. Klaus Liefelth (*iba*) für das Ermöglichen des Projektes (Tetraetherlipid) und Frau Dipl.-Biol. Steffi Grohmann (*iba*) für die Herstellung, Reinigung und Modifikation des GDNT und GDNT-Ps sowie für die Telefonate, Treffen und Diskussionen im Rahmen der Dissertation.

Mein Dank geht auch an Prof. A. Bigi für das Ermöglichen und besonders Dr. Elisa Boanini für die Durchführung der TEM-Untersuchungen in der *Università di Bologna*.

Außerdem danke ich auch Peter Binz und Dipl. Biol. Anja Matena aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. P. Bayer für das Anfertigen der vielen NMR-Spektren.

...und natürlich meinem Schatz für die Motivation und kreativen Korrekturen der Arbeit, ganz besonders aber meinen Eltern für die Unterstützung und das Bekochen während aller heißen Phasen des Studiums, der Diplomarbeit und auch der Dissertation, vor allem, als drei Tage vor dem ersten Abgabetermin auf einmal der Computer den Dienst einstellte...

6.3 Lebenslauf

Name: Martin Steinhäuser

Adresse: Falterweg 30

45279 Essen

Geburtsdatum: 27.04.1980

Geburtsort: Essen

Familienstand: ledig

Schulischer Werdegang:

1990-1996: Helene-Lange-Realschule in Essen-Steele

1996-2000: Gewerblich-Technische Unterrichtsanstalten der Stadt
Mülheim an der Ruhr

Abschluss: Fachhochschulreife

Beruflicher Werdegang:

1996-2000: Max-Planck-Institut für Strahlenchemie in Mülheim an
der Ruhr

Abschluss: Chemielaborant

2000-2006: Studium der Chemie an der Universität Duisburg-
Essen

Spezialisierung: Bio-medizinische Chemie

Abschluss: Diplomchemiker

Thema: Stabilisierung von Calciumphosphat-
Nanopartikeln über Proteine und Tetraetherlipide

2006-2009: Promotion an der Universität Duisburg-Essen

Thema: Stabilisierung und Funktionalisierung von Calciumphosphat-Nanopartikeln mit Proteinen und Tetraetherlipiden

DAAD-Austauschprojekte:

Universität Bologna, Arbeitskreis Prof. A. Bigi

Universität Bristol, Arbeitskreis Prof. S. Mann

Sonstige Qualifikationen:

Seit 2006: Dozent an der Kraftwerksschule e.V. - Powertech Training Center

Betreuung des Grundpraktikums Allgemeine- und Anorganische Chemie, Universität Duisburg-Essen

Ehrenamtliche Tätigkeiten:

1994-1997: Jugendfeuerwehr Essen Ost

Seit 1997: Freiwilligen Feuerwehr Horst - Eiberg

1997: Lehrgang über die Grundtätigkeiten der Feuerwehr

1999: Lehrgang für schweren Atemschutz nach G 26.3

2001: Lehrgang über die Tätigkeiten des Truppführers

2003: Lehrgang über Strahlenschutz

Lehrgang über Gefährliche Stoffe und Güter

2005-2006: Lehrgang „Pumpen-Maschinist“ (incl. Führerschein CE)

2007: Lehrgang Gruppenführer

2008-2009: Ausbilder der Jugendfeuerwehr Horst-Eiberg

6.4 Publikationsliste

Poster:

1. 13. Heiligenstädter Kolloquium:

„Funktionalisierung von Calciumphosphat-Nanopartikeln durch Proteine und Lipide“

M. Steinhäuser, M. Eppe, K. Liefeith*, S. Grohmann*

Institut für Anorganische Chemie, Universität Duisburg-Essen, Universitätsstrasse 5-7,
45117 Essen

*Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik e.V., Rosenhof, 37308 Heilbad
Heiligenstadt

2. German Ukrainian Symposium - Tagung an der Universität Duisburg-Essen:

Stabilization of calcium phosphate nanoparticles with a tetraetherlipid from *sulfolobus solfataricus*

M. Steinhäuser¹, M. Eppe¹, S. Grohmann², K. Liefeith²

¹ Institute of Inorganic Chemistry and Center for Nanointegration Duisburg-Essen
(CeNIDE), University of Duisburg-Essen, Germany

² Institute for Bioprocessing and Analytical Measurement Techniques (iba),
Heiligenstadt, Germany

6.5 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

**„Stabilisierung und Funktionalisierung von Calciumphosphat-Nanopartikeln
mit Proteinen und Tetraetherlipiden ”**

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe, und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Essen, im September 2009

Martin Steinhäuser

6.6 Literatur

1. Dorozhkin, S.V., Epple, M., *Die biologische und medizinische Bedeutung von Calciumphosphaten*. Angew. Chem., 2002. **114**: p. 3260-3277.
2. Dorozhkin, S.V., Epple, M., *Biological and medical significance of calcium phosphates*. Angew. Chem. Int. Ed., 2002. **41**: p. 3130-3146.
3. Epple, M., Peters, F., Schwarz, K., *Composite aus Polyglycolid und Calciumphosphat als potentielle Knochenersatzmaterialien*. Symposium 4: Werkstoffe für die Medizintechnik, Tagebücher der Werkstoffwoche. 1999, München: Wiley-VCH.
4. Tadic, D., Epple, M., *Kontinuierliche Herstellung von Knochenmineral-ähnlichen Calciumphosphat Keramiken*. Biomed. Technik, 2001: p. 224-225.
5. Detsch, R., Mayr, H., Ziegler, G., *Resorption behaviour of osteoclast-like cells on tricalciumphosphate and hydroxyapatite materials sintered with different temperatures*. European Conference on Biomaterials, 2006.
6. Tadic, D., Epple, M., *A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone*. Biomaterials, 2004. **25**: p. 987-994.
7. Rueger, J.M., *Knochenersatzmittel-Heutiger Stand und Ausblick*. Orthopäde, 1998. **27**: p. 72-79.
8. Hutmacher, D.W., *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage*. Biomaterials, 2000. **21**: p. 2529-2543.
9. Robinson, B.P., Hollinger, J.O., Szachowicz E.H., Brekke J., *Calvarial bone repair with porous D,L-polylactide*. Otolaryngol Head Neck Surg., 1995. **112**: p. 707-713.
10. Sobry, R., Van den Bossche, G., Fontaine, F., Barakat, I., Dubois, P., Jerome, R., *SAXS analysis of the morphology of biocompatible and biodegradable poly(ϵ -caprolactone-*B*-glycolide) copolymers*. J. Mol. Struct., 1996. **383**: p. 63-68.
11. Schubert, H., Meyer, M., Kage, A., Gross, U., *Entwicklung von Biomaterialien und Implantaten*. TU International, 2000. **48**: p. 4-6.
12. Chaudhry, A.A., Haque, S., Kellici, S., Boldrin, P., Rehman, I., Khalidc F.A., Darr, J.A., *Instant nano-hydroxyapatite: a continuous and rapid hydrothermal synthesis*. Chem. Commun., 2006: p. 2286-2288.

13. Habibovic, P., Barrere, F., Van Blitterswijk, C., De Groot, K., Layrolle, P.P., *Biomimetic hydroxyapatite coating on metal implants*. J. Am. Ceram. Soc., 2002. **85**: p. 517-522.
14. Sun, J.S., Lin, F.H., Hung, T.Y., Tsuang, Y.H., Chang, W.H.S., Liu, H.C., *The influence of hydroxyapatite particles on osteoclast cell activities*. J. Biomed. Mater. Res., 1999. **45**: p. 311-321.
15. Linhart, W., Peters, F., Lehmann, W., Schwarz, K., Schilling, A.F., Amling, M., Rueger, J.M., Epple, M., *Biologically and chemically optimized composites of carbonated apatite and polyglycolide as bone substitution materials*. John Wiley & Sons, Inc., 2000: p. 162-171.
16. Chesnutt, B.M., Viano, A.M., Yuan, Y., Yang, Y., Guda, T., Appleford, M.R., Ong, J.L., Haggard, W.O., Bumgardner, J.D., *Design and characterization of a novel chitosan nanocrystalline calcium phosphate composite scaffold for bone regeneration*. Wiley Periodicals, Inc, 2007: p. 491-501.
17. Dias, A.G., Lopes, M.A., Santos, J.D., Afonso, A., Tsuru, K., Osaka, A., Hayakawa, S., Takashima, S., Kurabayashi, Y., *In vivo performance of biodegradable calcium phosphate glass ceramics using the rabbit model: histological and SEM observation*. J. Biomater. Appl., 2006. **20**: p. 253-266.
18. Ikenaga, M., Hardouin, P., Lemaître, J., Andrianjatovo, H., Flautre, B., *Biomechanical characterization of a biodegradable calcium phosphate hydraulic cement: a comparison with porous biphasic calcium phosphate ceramics*. John Wiley & Sons, Inc., 1996: p. 139-144.
19. Gerhart, T.N., Renshaw, A.A., Miller, R.L., Noecker, R.J., Hayes C.W., *In vivo histologic and biomechanical characterization of a biodegradable particulate composite bone cement*. John Wiley & Sons, Inc., 1989: p. 1-16.
20. Chissov, V.I., Sviridova, I.K., Sergeeva, N.S., Kirsanova, V.A., Achmedova, S.A., Filiushin, M.M., Barinov, S.M., Fadeeva, I.V., Komlev, V.S., Smirnov, V.V., *In vitro study of matrix surface properties of porous granulated calcium phosphate ceramic materials made in russia*. Bull. Exp. Bio. Med., 2007. **145**: p. 499-503.
21. Zyman, Z., Glushko, A., Dedukh, N., Malyshkina, S., Ashukina, N., *Porous calcium phosphate ceramic granules and their behaviour in differently loaded areas of skeleton*. J. Mater. Sci.: Mater Med, 2007. **19**: p. 2197-2205.

22. Baksh, D., Davies, J.E., Kim, S., *Three-dimensional matrices of calcium phosphates support bone growth in vitro and in vivo*. J. Mater. Sci. Mater. Med., 1998. **9**: p. 743-748.
23. Langer, R., *Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: one laboratory' experience*. Acc. Chem. Res., 2000. **33**: p. 94-101.
24. Schaefer, D.J., Kneser, U., *Künstliche Gewebe - Tissue Engineering auch in der Zahnmedizin*. 2001. **91**: p. 48-52.
25. Müller, R., Paulke, B.R., *Kolloide als Arzneistoffträger in der Medizin*. Spektrum der Wissenschaft, 1994. **8**: p. 102-108.
26. Cancedda, R., Cedolab, A., Giulianic, A., Komlev V., Lagomarsino, S., Mastrogiacomo, M., Peyrine, F., Rustichelli, F., *Bulk and interface investigations of scaffolds and tissue-engineered bones by X-ray microtomography and X-ray microdiffraction*. Biomaterials, 2007. **28**: p. 2505-2524.
27. Gelinsky, M., Welzel, P.B., Simonc, P., Bernhardt, A., König, U., *Porous three-dimensional scaffolds made of mineralised collagen: Preparation and properties of a biomimetic nanocomposite material for tissue engineering of bone*. Chem. Eng. J., 2007. **137**: p. 84-96.
28. Schieker, M., Seitz, H., Drosse, I., Seitz, S., Mutschler, W., *Biomaterials as scaffold for bone tissue engineering*. Eur. J. Trauma, 2006. **2**.
29. Deisinger, U., Detsch, R., Leiderer, M., Ziegler, G., *Einfluss der Phasenzusammensetzung auf das Zellverhalten bei porösen Keramik-Scaffolds für das Tissue Engeneering Biomaterialien*, 2006. **7**(3): p. 137.
30. Amling, M., Schilling, A.F., Pogoda, P., Priemel, M., Rueger, J.M., *Biomaterials and bone remodeling: the physiologic process required for biologization of bone substitutes*. Eur. J. Trauma, 2006. **2**: p. 102-106.
31. Franz-Odenaal, T.A., Hall, B.K., Witten, P.E., *Buried alive: how osteoblasts become osteocytes*. Dev. Dynam., 2006. **235**: p. 176-190.
32. Teitelbaum, S.L., Tondravi, M.M., Ross, F.P., *Osteoclasts, macrophages, and the molecular mechanisms of bone resorption*. J. Leucocyte Biol., 1997. **61**: p. 381-388.
33. Dörfler, H.D., *Grenzflächen- und Kolloidchemie*. 1994, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo: VCH Verlagsgesellschaft mbH.

34. Dörfler, H.D., *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme*. 2002, Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Tokio: Springer-Verlag.
35. Everett, D.H., *Grundzüge der Kolloidwissenschaft*. 1992, Darmstadt: Steinkopf-Verlag.
36. Bogensberger, S., *Roche Lexikon Medizin*. 1998, München, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm: Urban & Fischer.
37. Antonietti, G.M., Göltner, C., *Überstrukturen funktioneller Kolloide: eine Chemie im Nanometerbereich*. Angew. Chem., 1997. **109**: p. 944-947.
38. Epple, M., *Biomaterialien und Biomineralisation*. 2003, Stuttgart, Leipzig, Wiesbaden: Teubner-Verlag.
39. Voet, D., Voet J.G., Pratt C.W., *Lehrbuch der Biochemie*. 2002, Weinheim: WILEY-VCH Verlag. p. 83-256.
40. *Diverse Internetseiten*, 2009
41. Sigma Aldrich - Product Information, *Albumin from bovine serum*.
42. Chen, Z.J., Sun, L.J., *Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling*. Molecular Cell, 2009. **275-286**: p. 3.
43. de Rosa, M., *Archaeal lipids: structural features and supramolecular organization*. Thin solid films, 1996. **284-285**: p. 13-17.
44. Vilalta, I., Gliozzi, A., Prats, M., *Interfacial air/water proton conduction from long distances by sulfolobus solfataricus archaeal bolaform lipids*. Eur. J. Biochem., 1996. **240**: p. 181-185.
45. Martins, L.O., Huber, R., Huber, H., Stetter, K.O., da Costa, M.S., Santos, H., *Organic solutes in hyperthermophilic archaea*. Appl. Environ. Microbiol., 1996. **63**: p. 896-902.
46. Prieur, D., Erauso, G., Jeanthon, C., *Hyperthermophilic life at deep-sea hydrothermal vents*. Planet, Space Sci., 1994. **43**: p. 115-122.
47. Bakowsky, U., Rothe, U., Antonopoulos, E., Martini, T., Henkel, L., Freisleben, H.J., *Monomolecular organization of the main tetraether lipid from thermoplasma acidophilum at the water–air interface*. Chem. Phys. Lipids, 2000. **105**: p. 31-42.
48. Benvegna, T., Brard, M., Plusquellec, D., *Archaeobacteria bipolar lipid analogues: structure, synthesis and lyotropic properties*. Curr. Opin. Colloid Interface Sci. , 2004. **8**: p. 469-479.

49. Benvegna, T., Lemiègre, L., Cammas-Marion, S., *Archaeal Lipids: Innovative Materials for Biotechnological Applications*. Eur. J. Org. Chem., 2008: p. 4725-4744.
50. Blöcher, D., Gutermann, R., Henkel, B., Ring, K., *Physicochemical characterization of tetraether lipids from thermoplasma acidophilum. V. Evidence for the existence of a metastable state in lipids with acyclic hydrocarbon chains*. Biochim. Biophys. Acta 1989. **1024**: p. 54-60.
51. Blöcher, D., Ring, K., *Mixtures of tetraetherlipids from thermoplasma acidophilum with varying degree of cyclization show a kinetic effect for a metastable phase*. Chem. Phys. Lipids, 1991. **58**: p. 223-229.
52. Ernst, M., Freisleben, H.J., Antonopoulos, E., Henkel, L., Mlekusch, W., Reibnegger, G., *Calorimetry of archaeal tetraether lipid-indication of a novel metastable thermotropic phase in the main phospholipid from thermoplasma acidophilum cultured at 59°C*. Chem. Phys. Lipids, 1998: p. 1-12.
53. Frant, M., *Funktionalisierung von Biowerkstoffen durch biomimetische Strukturen auf der Basis von Tetraetherlipiden - ein Antifoulingkonzept*. Dissertation Halle-Witteberg, 2008.
54. Jarrell, H.C., Zukotynski, K.A., Sprott, G.D., *Lateral diffusion of the total polar lipids from thermoplasma acidophilum in multilamellar liposomes*. Biochim. Biophys. Acta 1998. **1369**: p. 259-266.
55. Pum, D., Schuster, B., Sára, M., Sleytr, U.B., *Functionalisation of surfaces with S-layers*. IEE Proc. Nanobiotechnol., 2004. **151**: p. 83-86.
56. Jannasch, H.W., Wirsén, C.O., Molyneux, S.J., *Comparative physiological studies on hyperthermophilic archaea isolated from deep-sea hot vents with emphasis on pyrococcus strain GB-D*. Appl. Environ. Microbiol., 1992: p. 3472-3481.
57. Erauso, G., Reysenbach, A.L., Godfroy, A., Meunier, J.M., Crump, B., Partensky, F., Baross, J.A., Marteinsson, V., Barbier, G., Pace, N.R., Prieur, D., *Pyrococcus abyssi sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent*. Arch. Microbiol., 1993. **160**: p. 338-349.
58. Antonopoulos, E., Freisleben, H.J., Zimmer, G., Rothe, U., Bakowsky, U., *Medizinische und technische Einsatzmöglichkeiten archaealer Tetraetherlipide*. GIT Labor-Fachzeitschrift, 1998. **7**: p. 678-679.

59. Gulik, A., Tchoreleff, P., Proust, J.E., *Bipolar tetraether lipid monolayers: correlation between interfacial properties and superficial structures as observed by electron microscopy*. Chem. Phys. Lipids, 1990. **53**: p. 341-346.
60. Hanford, M.J., Peeples, T.L., *Archael tetraether lipids*. Appl. Environ. Microbiol., 2000. **97**: p. 45-61.
61. Melikyan, G.B., Matinyan, N.S., Kocharov, S.L, Arakelian, V.B., Prangishvili, D.A., Nadareishvili, K.G., *Electromechanical stability of planar lipid membranes from bipolar lipids of the thermoacidophilic archaebacterium sulfolobus acidocaldarius*. Biochim. Biophys. Acta 1991. **1068**: p. 245-248.
62. Nicolaus, B., Trincone, A., Esposito, E., Vaccaro, M.R., Gambacorta, A., De Rosa, M., *Calditol tetraether lipids of the archaebacterium sulfolobus solfataricus*. Biochem. J., 1990. **266**: p. 785-791.
63. Gabriel, J.L., Chong, P.L.G., *Molecular modeling of archaeobacterial bipolar tetraether lipid membranes*. Chem. Phys. Lipids, 2000. **105**: p. 193-200.
64. Beveridge, T.J., Choquet, C.G., Patel, G.B., Sprott, G.D., *Freeze-fracture planes of methanogen membrane correlate with the content of tetraether lipids*. J. Bacteriol., 1992. **175**: p. 1191-1197.
65. Sprott, G.D., *Structures of archaeobacterial membrane lipids*. J. Bioenerg. Biomembr., 1992. **24**: p. 555-566.
66. Gambacorta, A., Caracciolo, G., Trabasso, D., Izzo, I., Spinella, A., Sodano, G., *Biosynthesis of calditol, the cyclopentanoid containing moiety of the membrane lipid of the sulfolobus solfataricus*. Tetrahedron Lett., 2002. **43**: p. 451-453.
67. Gliozzi, A., Paoli, G., de Rosa, M., Gambacorta, A., *Effect of isoprenoid cyclisation on the transition temperature of lipids in thermophilic archaeanacteria*. Biochim. Biophys. Acta 1983. **735**: p. 234-242.
68. Gliozzi, A., Rolandi, R., de Rosa, M., Gambacorta, A., *Monolayer black membranes from bipolar lipids of archaebacteria and their temperature-induced structure changes*. J. Membr. Biol., 1983. **75**: p. 45-56.
69. Gliozzi, A., Relini, A., Rolandi, R., Dante, S., Gambacorta, A., *Organization of bipolar lipids in monolayer at the air-water interface*. Thin solid films, 1994. **242**: p. 208-212.
70. Bakowsky, U., Kneuer, C., Rothe, U., Liefelth, K., Frant, M., Doelling, K., Schmid, R., Johnsen, H., Stenstad, P.M., *Production of composites containing tetraether lipids*. PCT Int. Appl., 2006: p. 37 pp.

71. Frant, M., Stensted, P., Johnsen, H., Dölling, K., Rothe, U., Schmid, R., Liefelth, K., *Anti-infective surfaces based on tetraether lipids for peritoneal dialysis catheter systems*. Materialwiss. Werkstofftech., 2006. **37**: p. 538-545.
72. Sateesh, A., Vogel, J., Dayss, E., Fricke, B., Doelling, K., Rothe, U., *Surface modification of medical-grade polyurethane by cyanurichloride-activated tetraether lipid (a new approach for bacterial antiadhesion)*. J. Biomed. Mater. Res. Part A 2008. **84A**: p. 672-681.
73. Müller, S., Pfannmöller, M., Teuscher, N., Heilmann, A., Rothe, U., *New method for surface modification of nanoporous aluminum oxide membranes using tetraether lipid*. J. Biomed. Nanotech., 2006. **2**: p. 16-22.
74. Gufler, P.C., Pum, D., Sleytr, U.B., Schuster, B., *High robust lipid membranes of crystalline S-layer supports investigated by electrochemical impedance spectroscopy*. Biomembranes, 2004. **1661**: p. 154-165.
75. Bakowsky, U., Kneuer, C., Rothe, U., Liefelth, K., Dölling, K., Schmid, R., Johnsen, H., Stenstad, P.M., *Composite materials comprising tetraether lipids and production of said materials*, S.a.I.T.R. GmbH, Editor. 2005.
76. Dayyoub, R., Sitterberg, J., Rothe, U., Bakowsky, U., *New antibacterial, anti adherent films based on self assemblies of modified tetraetherlipids*. Adv. Sci. Tech., 2008. **57**: p. 188-194.
77. Ulmer, M., *Innovative Oberflächen mit Potential zur Anwendung in Lebensmittelverarbeitung*. 2008.
78. Wetzer, B., Pum, D., Sleytr, U.B., *S-Layer stabilized solid supported lipid bilayers*. J. Struct. Biol., 1997. **119**: p. 123-129.
79. Eigenbrod, V., Wagner, P., *Antihafbeschichtung nach dem Vorbild der Natur*. Nanotechnologie, 2005.
80. -4H- JENA engineering GmbH, *Antifouling - biomimetische Konzepte*.
81. Schwiertz, J., *Nanokapseln durch Beschichtung von Calciumphosphat-Nanopartikeln mit Polymeren*. Diplomarbeit, Universität Duisburg-Essen, 2005.
82. Urch, H., *Untersuchung von funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln*. Diplomarbeit, Universität Duisburg-Essen, 2005.
83. Steinhäuser, M., *Stabilisierung von Calciumphosphat-Nanopartikeln über Proteine und Tetraetherlipide*, Diplomarbeit, Universität Duisburg-Essen, 2006.
84. Hunter, R.J., *Zeta potential in colloid science*. Academic Press., 1988.
85. Malvern Instruments, *Manual: zetasizer nano series.*, 2003.

86. Trotter, H., Zaman, A.A., Richards, P., *Preparations and characterization of polymer composite multilayers on SiO₂*. J. Colloid Interface Sci., 2005. **286**: p. 233-238.
87. Dorozhkin, S.V., Eppe, M., *In vitro simulation of calcium phosphate crystallisation from modified simulated body fluid*. Eur. J. Trauma, 2002. **28**: p. 115-116.
88. Günther, H., *NMR-Spektroskopie*. 1992, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
89. Naumer, H., Heller, W., *Untersuchungsmethoden in der Chemie*. 1986, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
90. Otto, M., *Analytische Chemie*. 2000, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto: WILEY-VCH Verlag.
91. Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B., *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. 2002, Stuttgart, New York: Thieme Verlag.
92. Goodhew, P.J., Humphreys, F.J., *Elektronenmikroskopie - Grundlagen und Anwendung*. 1991: McGraw Hill Book Company (UK) Ltd.
93. Küster, F.W., Thiel A., *Rechentafeln für die Chemische Analytik*. 1993, Berlin, New York: Walter de Gruyter.
94. Care, F.M., *Dialyse Kompakt - Über Funktion, Krankheit, und Therapie der menschlichen Niere*. p. 1-16.
95. Charytan, C., Gupta, B., Meindel, N., Spinowitz, B., *Fractional direct dialysis quantification: A new approach for prescription and monitoring hemodialysis therapy*. Kidney Int., 1996. **50**: p. 1845-1849.
96. Welzel, T., Meyer-Zaika, W., Eppe, M., *Continuous preparation of functionalised calcium phosphate nanoparticles with adjustable crystallinity*. Chem. Commun., 2004: p. 1204-1205.
97. Sokolova, V.V., Radtke, I., Heumann, E., Eppe, M., *Effective transfection of cells with multi-shell phosphate-DNA nanoparticles*. Biomaterials, 2006. **27**: p. 3147-3153.
98. *ChemBioDraw Ultra*. 1986-2007, Cambridge Software.
99. Bode, M.L., Buddoo, S.R., Minnaar, S.H., du Plessis, C.A., *Extraction, isolation and NMR data of the tetraether lipid, calditoglycerocaldarchaeol (GDNT) from sulfolobus metallicus harvested from a bioleaching reactor*. Chem. Phys. Lipids, 2008: p. 1-11.

100. Lo, S.L., Montague, C.E., Chang, E.L., *Purification of glycerol dialkyl nonitol tetraether from sulfolobus acidocaldarius*. J. Lipid Res., 1989. **30**: p. 944-949.
101. Mirghani, Z., Bertoia, D., Gliozzi, A., de Rosa, M., Gambacorta, A., *Monopolar-bipolar lipid interactions in model membrane systems*. Chem. Phys. Lipids, 1990. **55**: p. 85-96.
102. Sugai, A., Sakuma, R., Fukuda, I., Kurosawa, N., Itoh, Y.H., Kon, K., Ando, S., Itoh, T., *The structure of the core polyol of the ether lipids from sulfolobus acidocaldarius*. Lipids, 1995. **30**: p. 339-344.
103. de Rosa, M., de Rosa, S., Gambacorta, A., Bu'lock, J.D., *Structure of calditol, a new branched-chain nonitol, and of the derived tetraether lipids in thermoacidophile archaebacteria of the caldariella group*. Phytochemistry, 1979. **19**: p. 249-254.
104. Dorozhkin, S.V., Dorozhkina, E.I., Eppe, M., *A model system to provide a good in vitro simulation of biological mineralization*. Cryst. Growth Des., 2004. **4**: p. 389-395.
105. Liu, J., Stace-Naughton, A., Jiang, X., Brinker, C.J., *Porous nanoparticles supported lipid bilayers (protocells) as delivery vehicles*. J. Am. Chem. Soc., 2008. **131**: p. 1354-1355.
106. Knowles, T.J., Finka, R., Smith, C., Lin, Y.P., Dafforn, P., Overduin, M., *Membrane proteins solubilized intact in lipid containing nanoparticles bounded by styrene maleic acid copolymer*. J. Am. Chem. Soc., 2009. **131**: p. 7484-7485.
107. Bhaskar, K., Anbu, J., Ravichandiran, V., Venkateswarlu, V., Rao, M.J., *Lipid nanoparticles for transdermal delivery of flurbiprofen: formulation, in vitro, ex vivo and in vivo studies*. Lipids Health Dis, 2009. **8**.
108. Ohshima, H., Miyagishima, A., Kurita, T., Makino, Y., Iwao, Y., Sonobe, T., Itai, S., *Freeze-dried nefedipine-lipid nanoparticles with long-term nano-dispersion stability after reconstitution*. Int. J. Pharm., 2009. **337**: p. 180-184.
109. Froude, V.E., Zhu, Y., *Dielectrophoresis of functionalized lipid unilamellar vesicles (liposomes) with contrasting surface constructs*. J. Phys. Chem. B., 2008. **113**: p. 1552-1558.
110. Riehemann, K., Schneider, S.W., Luger, A.T., Godin, B., Ferrari, M., Fuchs, H., *Nanomedizin - Herausforderung und Perspektiven*. Angew. Chem., 2009. **121**: p. 886-913.

111. Lee, K.E., Cho, S.H., Lee, H.B., Jeong, S.Y., Yuk, S.H., *Mircoencapsulation of lipid nanoparticles containing lipophilic drug*. J. Microencapsulation, 2003. **20**: p. 489-496.
112. Bi, R., Shao, W., Wang, Q., Zhang, N., *Solid lipid nanoparticles as insulin inhalation carriers for enhanced pulmonary delivery*. J. Biomed. Nanotech., 2009. **5**: p. 84-92.
113. Kuo, Y.C., Lin, T.W., *Electrophoretic mobility, zeta potential and fixed charge density of bovine knee chondrocytes, methyl methacrylate-sulfopropyl methacrylate, polybutylcyanoacrylate, and solid lipid nanoparticles*. J. Phys. Chem. B., 2005. **110**: p. 2202-2208.
114. Helgason, T., Awad, T.S., Kristbergsson, K., McClements, D.J., Weiss, J., *Effect of surfactant surface coverage on formation of solid lipid nanoparticles (SLN)*. J. Colloid Interface Sci., 2009. **334**: p. 75-81.
115. Awad, T.S., Helgason, T., Weiss, J., Decker, E.A., McClements, D.J., *Effect of omega-3 fatty acids on crystallisation, polymorphic transformations and stability of tripalmitin solid lipid nanoparticle suspensions*. Cryst. Growth Des., 2009.
116. Martins, S., Silvia, A.C., Ferreira, D.C., Souto, E.B., *Improving oral absorption of salmon calcitonin by trimyristin lipid nanoparticles*. J. Biomed. Nanotech., 2009. **5**: p. 76-83.
117. Attama, A.A., Weber, C., Mueller-Goymann, C.C., *Assessment of drug permeation from lipid nanoparticles formulated with a novel structured lipid matrix through artificial skin construct bio-engineered from HDF and HaCaT Cell lines*. J. Drug Del. Sci. Tech., 2008. **18**: p. 181-188.
118. Freitas, C., Muller, R.H., *Stability determination of solid lipid nanoparticles (SLN) in aqueous dispersion after addition of electrolyte*. J. Microencapsulation, 1999. **16**: p. 59-71.
119. Pandatia, D., Ahuja, A., Velpandian, T., Lather, V., Dutta, T., Khar, R.K., *Characterization and in vitro assessment of paclitaxel loaded lipid nanoparticles formulated using modified solvent injection techniques*. Pharmazie, 2009. **64**: p. 301-310.
120. Lv., Q., Yu, A., Xi, Y., Li, H., Song, Z., Cui, J., Cao, F., Zhai, G., *Development and evaluation of penciclovir-loaded solid lipid nanoparticles for topical delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 2009. **372**(1-2): p. 191-198.

121. Chattopadhyay, N., Zastre, J., Wong, H.L., Wu, X.Y., Bendayan, R., *Solid lipid nanoparticles enhance the delivery of the HIV protease inhibitor, atazanavir, by a human brain endothelial cell line*. Pharm. Res., 2008. **25**: p. 2262-2271.
122. Souto, E.B., Müller, R.H., *Applications of lipid nanoparticles in food industry*. J. Food Technol., 2006. **4**: p. 90-95.
123. Castro, G.A., Ferreira, A.M., Oréface, R.L., Buono, T.L., *Characterization of a new solid lipid nanoparticle formulation containing retinoic acid for topical treatment of acne*. Powder Diffr., 2008. **23**: p. 30-35.
124. Müller, R.H., Mäder, C., Gohla, S., *Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery*. Eur. J. Pharm. Biopharm., 2000. **50**: p. 161-177.
125. Chen, B., Ren, X., Neville, T., Jerome, W.G., Hoyt, D.W., Sparks, D., Ren, G., Wang, J., *Apolipoprotein A tertiary structures determine stability and phospholipid-binding activity of discoidal high-density lipoprotein particles of different sizes*. Protein Sci., 2008. **18**: p. 921-935.
126. Kakizawa, Y., Furukawa, S., Kataoka, K., *Block copolymer-coated calcium phosphate nanoparticles sensing intracellular environment for oligodeoxynucleotide and siRNA delivery*. J. Controlled Release, 2003. **97**: p. 345-356.
127. Termine, J.D., Peckauskas, R.A., Posner, A.S., *Calcium phosphate formation in vitro*. Arch. Biochem. Biotechnol., 1970. **140**: p. 318-325.
128. Cai, Y., Tang, R., *Calcium phosphate nanoparticles in biomineralization and biomaterials*. J. Mater. Chem., 2008. **18**: p. 3775-3787.
129. Shkilnyy, A., Friedrich, A., Tiersch, B., Schöne, S., Fechner, M., Koetz, J., Schläpfer, C.W., Taubert, A., *Poly(ethylene imine)-controlled calcium phosphate mineralization*. Langmuir, 2007. **24**: p. 2102-2109.
130. Andres, C.S., V.; Lee, D.; Gun'ko, Y., Kotov, N., *Anisotropic calcium phosphate nanoparticles coated with 2-carboxyethylphosphonic acid*. Journal of Materials Chemistry, 2006. **16**: p. 3964-3968.
131. Garris, J.P., Sikes, C.S., *Use of polyamino acid analogs of biomineral proteins in dispersion of inorganic particulates important to water treatment*. Colloids Surf., A 1993. **80**: p. 103-112.
132. Schwiertz, J., Meyer-Zaika, W., Ruiz-Gonzalez, L., Gonzáles-Calbet, J.M., Vallet-Regi, M., Epple, M., *Calcium phosphate nanoparticles as templates for*

- nanocapsules prepared by the layer-by-layer technique*. J. Mater. Chem., 2008. **18**: p. 3831-3834.
133. Neumann, M., Epple, M., *Composites of calcium phosphate and polymers as bone substitution materials*. Eur. J. Trauma, 2006. **2**: p. 125-131.
 134. Bertoni, E., Bigi, A., Falini, G., Panzavolta, S., Roveri, N., *Hydroxyapatite/polyacrylic acid nanocrystals*. J. Mater. Chem., 1998. **9**: p. 779-782.
 135. Dorozhkina, E.I., Dorozhkin, S.V., *Application of the turbidity measurements to study in situ crystallization of calcium phosphates*. Colloids Surf., A 2001. **203**: p. 237-244.
 136. Bigi, A., Boanini, E., Gazzano, M., Kojdeckic, M.A., Rubinia, K., *Microstructural investigation of hydroxyapatite-polyelectrolyte composites*. J. Mater. Chem., 2003. **14**: p. 274-279.
 137. Peytcheva, A., Cölfen, H., Schnablegger, H., Antonietti, M., *Calcium phosphate colloids with hierarchical structure controlled by polyaspartates*. Colloid Polym. Sci., 2001. **280**: p. 218-227.
 138. Yamamoto, K., Kumagaim H., Suzaki, A., Arai, S., *Inhibitory activity of oligo- and poly-L-glutamic acids against calcium phosphate insolubilization and calcium binding with special relevance to their molecular weight dependence*. Biosci. Biotech. Biochem, 1994. **58**: p. 1662-1665.
 139. Meyer, F., Dimitrova, M., Jedrzejenska, J., Arntz, Y., Schaaf, P., Frisch, B., Voegel, J.C., Ogier, J., *Relevance of bi-functionalized polyelectrolyte multilayers for cell transfection*. Biomaterials, 2008. **29**: p. 618-624.
 140. Welzel, T., Radtke, I., Meyer-Zaika, W., Heumann, R., Epple, M., *Transfection of cells with custom-made calcium phosphate nanoparticles coated with DNA*. J. Mater. Chem., 2004. **14**: p. 2213-2217.
 141. Sokolova, V., Epple, M., *Anorganische Nanopartikel zum Transport von Nucleinsäuren in Zellen*. Angew. Chem., 2008. **120**: p. 1402-1416.
 142. Johnston, A.P.R., Caruso, F., *Exploiting the directionality of DNA: controlled shrinkage of engineered oligonucleotide capsules*. Angew. Chem. Int. Ed., 2007. **119**: p. 2731-2734.
 143. Zhang, Z., Gao, D., Zhao, H., Xie, C., Guan, G., Wang, D., Yu, S.H., *Biomimetic assembly of polypeptide-stabilized CaCO₃ nanoparticles*. J. Phys. Chem. C 2009. **110**: p. 8613-8618.

144. Segura, I., Gonzalez M.A., Serrano A., Abad J.L., Bernad A., Riese H.H., *High transfection efficiency of human umbilical vein endothelial cells using an optimized calcium phosphate method*. Anal. Biochem., 2001. **296**: p. 143-147.
145. Yang, Y.W., Yang, J.C., *Calcium phosphate as a gene carrier: electron microscopy*. Biomaterials, 1997. **18**: p. 213-217.
146. Sokolova, V., Prymak, O., Meyer-Zaika, W., Coelfen, H., Rehage, H., Shukla, A., Epple, M., *Synthesis and characterisation of DNA-functionalised calcium phosphate nanoparticles*. Materialwiss. Werkstofftech., 2006. **37**: p. 441-445.
147. Lode, A., Wolf-Brandstetter, C., Reinstorf, A., Bernhardt, A., König, U., Pompe, W., Gelinsky, M., *Calcium phosphate bone cements, functionalized with VEGF: release kinetics and biological activity*. J. Biomed. Mater. Res. Part A 2006: p. 474-483.
148. Han, Y., Li, S., Wang, X., *A novel thermolysis method of colloidal protein precursors to prepare hydroxyapatite nanocrystals*. Cryst. Res. Technol., 2008. **44**(3): p. 336-340.
149. Chane-Ching, J.Y., Lebugle, A., Rousselot, I., Pourpoint, A., Pelle, F., *Colloidal synthesis and characterization of monocrystalline apatite nanophosphors*. J. Mater. Chem., 2007. **17**: p. 2904-2913.
150. Palazzo, B., Iafisco, M., Laforgia, M., Margiotta, N., Natile, G., Bianchi, C.L., Walsh, D., Mann, S., Roveri, N., *Biomimetic hydroxyapatite-drug nanocrystals as potential bone substitutes with antitumor drug delivery properties*. Adv. Funct. Mater., 2007. **17**: p. 2180-2188.
151. Manjubala, I., Scheler, S., Bössert, J., Jandt, K. D., *Mineralisation of chitosan scaffolds with nano-apatite formation by double diffusion technique*. Acta Biomater., 2005. **2**: p. 75-84.
152. Dorozhkin, S.V., Dorozhkina, E.I., Epple, M., *Precipitation of carbonateapatite from a revised simulated body fluid in the presence of glucose*. J. Appl. Biomater. Biomech., 2003. **1**: p. 200-207.
153. Ganesan, K., Epple, M., *Calcium phosphate nanoparticles as nuclei for the preparation of colloidal calcium phytate*. New J. Chem., 2008. **32**: p. 1326-1330.
154. Ganesan, K., Kovtun, A., Neumann, S., Heumann, R., Epple, M., *Calcium phosphate nanoparticles: colloiddally stabilized and made fluorescent by a phosphate-functionalized porphyrin*. J. Mater. Chem., 2008. **18**: p. 3655-3661.

155. Uota, M., Arakawa, H., Kitamura, N., Yoshimura, T., Tanaka, J., Kijima, T., *Synthesis of high surface area hydroxyapatite nanoparticles by mixed surfactant-mediated approach*. Langmuir, 2005. **21**: p. 4724-2728.
156. Wiemann, M., Bingmann, D., Franzka, S., Hartmann, N., Urch, H., Eppe, M., *Oriented growth of osteoblast-like cells on two-dimensionally structured films of functionalized calcium phosphate nanoparticles on a silicon substrate*. Adv. Eng. Mater., 2007. **9**: p. 1077-1081.
157. Schilling, A.F., Filke, S., Brink, S., Korbmacher, H., Amling, M., Rueger, J.M., *Osteoclasts and biomaterials*. Eur. J. Trauma, 2006. **2**: p. 107-113.
158. Wensch, S., Stahl, J.P., Horas, U., Heiss, C., Kilian, O., Trinkaus, K., Hild, A., Schnettler, R., *In vivo mechanisms of hydroxyapatite ceramic degradation by osteoclasts: fine structural microscopy*. Wiley Periodicals, Inc., 2002: p. 713-718.
159. Urch, H., *Calciumphosphat-Nanopartikel als Basis für eine transfizierende Implantatbeschichtung* Dissertation, Universität Duisburg-Essen, 2008.
160. Schwiertz, J., *Funktionalisierte anorganische Nanopartikel: Von Nanokapseln, Photodynamischer Therapie und Thermochemie*. Dissertation, Universität Duisburg-Essen, 2008.
161. Peytcheva, A., Antonietti, M., *Carving on the nanoscale: polymers for the site-specific dissolution of calcium phosphate*. Angew. Chem. Int. Ed., 2001. **40**: p. 3380-3383.
162. Kibalczyk, W., Christoffersen, J., Christoffersen, M.R., Zielenkiewicz, A., Zielenkiewicz, W., *The effect of magnesium ions on the precipitation of calcium phosphates*. J. Cryst. Growth, 1990. **106**: p. 355-366.
163. Bradt, J.H., Mertig, M., Teresiak, A., Pompe, W., *Biomimetic mineralization of collagen by combined fibril assembly and calcium phosphate formation*. Chem. Mater., 1999. **11**: p. 2694-2701.
164. Tsortos, A., Nancollas, G.H., *The role of polycarboxylic acids in calcium phosphate mineralization*. J. Colloid Interface Sci., 2001. **250**: p. 159-167.
165. Christoffersen, M.R., Christoffersen, J., Kibalczyk, W., *Apparent solubilities of two amorphous calcium phosphates and of octacalcium phosphate in the temperature range 30-42°C*. J. Cryst. Growth, 1990. **106**: p. 349-354.
166. Füredi-Milhofer, H., Ofir P.B.Y., Sikiric, M., Garti, N., *Control of calcium phosphate crystal nucleation, growth and morphology by polyelectrolytes*. Key Eng. Mater., 2004. **254**: p. 11-14.

167. Xie, J., Riley, C., Chittur, K., *Effect of albumin on brushite transformation to hydroxyapatite*. John Wiley & Sons, Inc., 2001: p. 357-365.
168. Fowler, C.E., Li, M., Mann, S., Margolis, H.C., *Influence of surfactant assembly on the formation of calcium phosphate materials - a model for dental enamel formation*. J. Mater. Chem., 2005. **15**: p. 3317-3325.
169. Sugawara, A., Yamane, S., Akiyoshi, K., *Nanogel-templated mineralization: polymer-calcium phosphate hybrid nanomaterials*. Macromol. Rapid Commun., 2006. **24**: p. 441-446.
170. Wang, W., Shi, D., Lian, J., Guo, Y., Liu, G., Wang, L., Ewing, R.C., *Luminescent hydroxylapatite nanoparticles by surface functionalization*. Appl. Phys. Lett., 2006. **89**: p. 183106 1-3.
171. Meiser, F., Cortez, C., Caruso, F., *Biofunctionalization of fluorescent rare-earth-doped lanthanum phosphate colloidal nanoparticles*. Angew. Chem. Int. Ed., 2004. **116**: p. 6080-6083.
172. Zhang, L., Coffey, J.L., Xu, W., Zerda, T.W., *Luminescent Si nanoparticles in sol-gel matrices stabilized by amino acids*. Chem. Mater., 1997. **9**: p. 2249-2251.
173. Calvo, P., Vila-Jato, J.L., Alonso, M.J., *Effect of lysozyme on the stability of polyester nanocapsules and nanoparticles: stabilization approaches*. Biomaterials, 1997. **18**: p. 1305-1310.
174. Kim, M.J., An, G.H., Choa, Y.H., *Functionalization of magnetite nanoparticles for protein immobilization*. Solid State Phenom., 2007: p. 895-898.
175. Oh, K.S., Han, S.K., Lee, H.S., Koo, H.M., Kim, R.S., Lee, K.E., Han, S.S., Cho, S.H., Yuk, S.H., *Core/shell nanoparticles with lecithin lipid cores for protein delivery*. Biomacromolecules, 2006. **7**: p. 2362-2367.
176. Peng, Z.G., Hadajat, K., Uddin, M.S., *Selective and sequential adsorption of bovine serum albumin and lysozyme from a binary mixture on nanosized magnetic particles*. J. Colloid Interface Sci., 2004: p. 1-9.
177. Rezwan, K., Studart, A.R., Vörös, J., Gauckler L.J., *Change of zeta-potential of biocompatible colloidal oxide particles upon adsorption of BSA and lysozyme*. J. Phys. Chem. B., 2005. **109**: p. 14469-14474.
178. Vertegel, A.A., Siegel, R. W., Dordick, J. S., *Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme*. Langmuir, 2004. **20**: p. 6800-6807.

179. Voinescu, A.E., Touraud, D., Lecker, A., Pfitzner, A., Kunz, W., Ninham, B.W., *Mineralization of CaCO₃ in the presence of egg white lysozyme*. Langmuir, 2007. **23**: p. 12269-12274.
180. Wang, X., Sun, H., Xia, Y., Chen, C., Xu, H., Shan, H., Lu, J.R., *Lysozyme mediated calcium carbonate mineralization*. J. Colloid Interface Sci., 2009. **332**: p. 96-103.
181. Yang, T., Li, Z., Wang, L., Guo, L., Sun, Y., *Synthesis, characterization, and self-assembly of protein lysozyme monolayer-stabilized gold nanoparticles*. J. Am. Chem. Soc., 2007. **23**: p. 10533-10538.
182. Yoo, H.S., Choi, H.K., Park, T.G., *Protein-fatty acid complex for enhanced loading and stability within biodegradable nanoparticles*. J. Pharm. Sci., 2000. **90**: p. 195-201.
183. Deka, J., Paul, A., Chattopadhyay, A., *Sensitive protein assay with destination of conformations based on visible adsorption changes of citrate-stabilized gold nanoparticles*. J. Phys. Chem. C 2008.
184. Housni, A., Ahmed, M., Liu, S., Narain, R., *Monodisperse protein stabilized gold nanoparticles via a simple photochemical process*. J. Phys. Chem. C 2008. **112**: p. 12282-12290.
185. Hong, C., Yuan, R., Chai, Y., Zhuo, Y., *Amperometric Immunosensor for the Determination of α -1-Fetoprotein Based on Core-Shell-Shell Prussian Blue-BSA-Nanogold Functionalized Interface*. Electroanalysis, 2008. **20**: p. 2185-2191.
186. Kim, H.M., Jin, S.M., Lee, S.K., Kim, M.G., Shin, Y.B., *Detection of Biomolecular Binding Through Enhancement of Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR) by Gold Nanoparticles*. Sensors, 2009. **9**: p. 2334-2334.
187. Park, J., Joo, J., Kwon, S.G., Jang, Y., Hyeon, T., *Synthese monodisperser sphärischer Nanokristalle*. Angew. Chem., 2007. **119**: p. 4714-4745.
188. Cai, K., Bossert, J., Jandt, K. D., *Does the nanometre scale topography of titanium influence protein adsorption and cell proliferation*. Colloids Surf., B 2006. **49**: p. 136-144.
189. da Silva Gomes, G., de Almeida, A.T., Kosaka, P.M., Rogero, S.O., Cruz, Á.S., Ikeda, T.I., Petri, D.F.S., *Cellulose acetate propionate coated titanium: characterization and biotechnological application*. Mater. Res., 2007. **10**: p. 1-15.

190. You, C.C., Agasti, S.S., Rotello, Y.M., *Isomeric control of protein recognition with amin acid- and dipeptide-functionalized gold nanoparticles*. Chem. Eur. J., 2008. **14**: p. 143-150.
191. Deguchi, S., Yamazaki, T., Mukai, S., Usami, R., Horikoshi, K., *Stabilization of nanoparticles by protein adsorption and its implications for toxicity studies*. Chem. Res. Toxicol., 2009. **20**: p. 854-858.
192. Bousquet, Y., Swart, P.J., Schmitt-Colin, N., Velge-Roussel, F., Kuipers, M.E., Meijer, D.K.F., Bru, N., Hoebeke, J., Breton, P., *Molecular mechanism of the adsorption of a model protein (human serum albumin) on poly(methylidene malonate 2.1.2) nanoparticles*. Pharm. Res., 1998. **16**: p. 141-147.
193. He, P., Hu, N., Rusling, J.F., *Driving forces for layer-by-layer self-assembly of films of SiO₂ nanoparticles and heme proteins*. Langmuir, 2003. **20**: p. 722-729.
194. Laaksonen, P., Kivioja, J., Paananen, A., Kainlauri, M., Kontturi, K., Ahopelto, J., Linder, M.B., *Selective nanopatterning using citrate-stabilized Au nanoparticles and cystein-modified amphiphilic protein*. Langmuir, 2008.
195. Sergeev, B.M., Kiryukhin, M.V., Rubtsova, M.Y., Prusov, A.N., *Synthesis of protein A conjugates with silver nanoparticles*. Colloid J., 2002. **65**: p. 636-638.
196. Asuri, P., Karajanagi, S.S., Vertegel, A.A., Dordick, J.S., Kane, R.S., *Enhanced stability of enzymes adsorbed onto nanoparticles*. J. Nanosci. Nanotechnol., 2007. **7**: p. 1675-1678.
197. Shang, W., Nuffer, J.H., Dordick, J.S., Siegel, R.W., *Unfolding of ribonuclease A on silica nanoparticles surfaces*. Nano Letter, 2007. **7**: p. 1991-1995.
198. Vigneshwaran, N., Kathe, A.A., Varadarajan, P.V., Nachane, R.P., Balasubramanya, R.H., *Silver-protein (core-shell) nanoparticles production using spent mushroom substrate*. Langmuir, 2009. **23**: p. 7113-7117.
199. Lee, I.S., Lee, N., Park, S., Kim, B.H., Yi, Y.-W., Kim, T., Kim, T.K., Lee, I.H., Paik, S.R., Hyoen, T., *Ni/NiO core/shell nanoparticles for selective binding and magnetic separation of histidine-tagged proteins*. J. Am. Chem. Soc., 2006. **128**: p. 10658-10659.
200. Wu, H., Huo, Q., Varnum, S., Wang, J., Guodong, L., Nie, Z., Liu, J., Lin, Y., *Dye-doped silica nanoparticle labels/protein microarray for detection of protein biomarkers*. Analyst, 2008. **133**: p. 1550-1555.

201. Lundqvist, M., Sethson, I., Jonsson, B.H., *Protein adsorption onto silica nanoparticles: conformational changes depends on the particles' curvature and the protein stability*. Langmuir, 2009. **20**: p. 10639-10647.
202. Joeng, K.J., Butterfield, K., Panitch, A., *A novel assay to probe heparin-peptide interactions using pentapeptide-stabilized gold nanoparticles*. Langmuir, 2009. **24**: p. 8794-8800.
203. Jin, Y., Wang, P., Yin, D., Liu, J., Qiu, H., Yu, N., *Gold nanoparticles stabilized in a novel period mesoporous organosilica of SBA-15 for styrene epoxidation*. Microporous Mesoporous Mater., 2007. **111**: p. 569-576.
204. Laaksonen, T., Ahonen, P., Johans, C., Kontturi, K., *Stability and electrostatics of mercaptoundecanoic acid-capped gold nanoparticles with vary counterion size*. ChemPhysChem, 2006. **7**: p. 2143-2149.
205. Mahltig, B., Gutmann, E., Meyer, D.C., Reibold, M., Bund, A., Böttcher, H., *Thermal preparation and stabilization of crystalline silver particles in SiO₂-based coating solutions*. J. Sol-Gel Sci. Technol., 2009. **49**: p. 202-208.
206. Radhakrishnan, B., Constable, A.N., Brittain, W.J., *A novel route to organic-inorganic hybrid nanomaterials*. Macromol. Rapid Commun., 2008: p. 1828-1833.
207. General, S., Thünemann, A. F., *pH-sensitive nanoparticles of poly(amino acid) dodecanoate complexes*. Int. J. Pharm., 2001. **230**: p. 11-24.
208. Lundqvist, M., Stigler, J., Elia, G., Lynch, I., Cedervall, T., Dawson, K.A., *Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts*. Appl. Phys. Sci., 2008. **105**: p. 14265-14270.
209. Kim, S., Kim, C.A., Choi, Y.H., Jung, M.Y., *Synthesis of polystyrene nanoparticles with different surface modifications by emulsion polymerization and measurement of IgG adsorption and stability for the application in latex-protein complex based solid-phase immunoassay*. Polym. Bull., 2008. **62**: p. 23-32.
210. Masuda, T., Akita, H., Nishio, T., Niikura, K., Kogure, K., Ijima, K., Harashima, H., *Development of lipid nanoparticles targeted via sugar-lipid conjugates as novel nuclear gene delivery system*. Biomaterials, 2007. **29**: p. 709-723.